

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**Implicación de nuevas moléculas de la vía de señalización  
de Ras en el cáncer de mama**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Cristian Suárez Cabrera**

DIRECTORES

**Ángel Ramírez Merino**  
**Manuel Navarro Espinel**

**Madrid, 2018**

**Universidad Complutense de Madrid -**

**Facultad de Ciencias Biológicas -**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular -**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**TESIS DOCTORAL**

**Implicación de nuevas moléculas de la vía de  
señalización de Ras en el cáncer de mama**

**Cristian Suárez Cabrera**

**Madrid, 2017**





**Universidad Complutense de Madrid -**  
**Facultad de Ciencias Biológicas -**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular -**



**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID**

**TESIS DOCTORAL**

**Implicación de nuevas moléculas de la vía de  
señalización de Ras en el cáncer de mama**

Memoria presentada por Cristian Suárez Cabrera para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la Unidad de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), bajo la dirección de los Doctores Ángel Ramírez Merino y Manuel Navarro Espinel.

**Dr. Ángel Ramírez Merino**

**Dr. Manuel Navarro Espinel**

**Cristian Suárez Cabrera**

**Madrid, 2017**



***A mis padres y mi hermana, -***



***“La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza”***

Albert Einstein (1879-1955)



## Agradecimientos -

---

Esta tesis doctoral va dedicada a todas aquellas personas que a lo largo de estos años han contribuido a que este trabajo haya sido posible, tanto a nivel científico como personal.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de tesis su esfuerzo y dedicación. Manuel y Ángel, gracias. Empezar una tesis doctoral siempre supone un reto y, de forma añadida, yo me enfrenté a un cambio radical. Sin su ayuda y apoyo no lo habría logrado. Gracias por transmitirme sus conocimientos, por enseñarme casi todo lo que sé, por valorar siempre mis opiniones e iniciativas, por confiar en mí y hacerme sentir uno más. Ha sido un placer realizar este trabajo mano a mano y espero que no sea el último.

A Jesús Paramio, por esas largas charlas sobre ciencia, libros y películas, por tus consejos y, sobre todo, por demostrarme que mi trabajo durante estos cuatro años ha sido valorado.

Gracias a todos los miembros de la Unidad de Oncología Molecular, a Angus, a Llanos, a Carmen, a Mirentxu, a Corina y a Ramón. Por brindarme su ayuda siempre que la he necesitado. A Jesús Ramírez, a Edilia y a todas las chicas del animalario. Sin su labor esta tesis no hubiera sido posible.

A Marta y a Olga, por acogerme desde el primer momento que llegué y seguir estado a mi lado a día de hoy. Hemos vivido muchos momentos a lo largo de estos años dentro y fuera del laboratorio y estaré eternamente agradecido por cada uno de ellos. A La Jose, por todo lo que me has enseñado y por todo lo que hemos aprendido juntos. El camino a tu lado ha sido más fácil, aunque conseguir un abrazo tuyo haya sido una ardua tarea. ¡¡Tú eres la siguiente!! A Mónica, por tus consejos y tu inestimable ayuda. Siempre he admirado tu espíritu crítico y de autosuperación, espero que me hayas contagiado un poco. A Miriam, mi compañera de profesión. Gracias por tu alegría, por tus ánimos y por tu ayuda. A Sara, mi inquieta favorita, gracias por tu apoyo y mucho ánimo, lo bueno está por venir.

A Fer, Pablo, Laura, Irene, Antonio y Adrián, porque su paso por el laboratorio nos ha alegrado a todos. A Bárbara, fuiste un motor en este proyecto y siempre te estaré agradecido. Tu esfuerzo y tu trabajo duro te han llevado lejos y más lejos que vas a llegar. Disfruta esta experiencia, te lo mereces.

A Carol, la versión femenina de mí mismo, gracias por tantas horas compartidas en el laboratorio y fuera de él, por revivir mis alegrías y mis frustraciones. Sin ti este trayecto no hubiera sido igual. Porque me siento raro si llegan las 7 de la tarde y no escucho un grito que diga: “¡VeneSuela! ¡Deja eso y a merendar!”. Por tu ayuda incondicional siempre que lo he necesitado y por tu confianza. Por todas las noches en el Ginos después de salir a las tantas de trabajar, por las comilonas en Casa Paco y, como no, por el tequila. Empezamos juntos la cuenta atrás, y juntos la acabaremos. Ánimo, que tu gran momento se acerca. Por todo eso y por mucho más que las palabras no pueden describir, gracias.

A Cristina Segovia, a todas ellas. Gracias por depositar en mí siempre tanta confianza, por estar siempre dispuesta a echar una mano y por recibirme cada mañana con una sonrisa (e



incluso un ronroneo). Porque una clase de bricomanía al atardecer anima a cualquiera y si es en vasco... mejor que mejor. Recuerda, despacito pero con buena letra, todo llega.

¡A mi liniero favorito! Sergio, sabes que contigo siempre me sobran las palabras, pero no puedo evitar decirte lo importante que ha sido para mí tu apoyo y tu amistad en este tramo final. Gracias por levantarme el ánimo cada día y por ser esa mala influencia que se necesita de vez en cuando. Sabes que te admiro mucho como persona y como científico, y que nuestras largas conversaciones no han llegado a su fin. Mucho ánimo y sigue luchando que... ¡Ya no queda nada!!!

A Fran, gracias por ser tú. Gracias por la confianza depositada en mí y por celebrar mis triunfos como si fueran tuyos. Gracias por tu interés, por tu apoyo y por tu constancia tanto en lo laboral como en lo personal. Gracias por hacer que los jueves sean mi día favorito de la semana. Sigue tu camino y tus sueños, que vas a llegar muy lejos. Mucha suerte en esta etapa final, aunque no la necesitas. Como dijo un gran pensador: A ver qué tal...

A todos los integrantes de la división de hematopoyesis: a Juan Bueren, a Paula, a Marina, a Maruja, a Oscar, a Guille, a Jose Carlos, a Rebe, a María y un largo etcétera. Gracias a todos por la ayuda y colaboración inestimable durante estos años. En especial, a los peque-hematos, por acogerme como a uno más. A Yari, por estar siempre dispuesto a todo y darlo todo por los demás. A Charlos, por sacarme siempre una sonrisa solo con mirarme. El trabajo y la perseverancia han dado sus frutos y ¡jme alegro mucho por ello!! A mi pucelana favorita, Virgi, ánimo en este trayecto y recuerda que una tila a tiempo hace milagros. A Cris, por tu salero y tu desparpajo. A Sara, gracias por tu alegría y tus frikadas. A Fans, porque la tranquilidad y el desfase no están reñidos, y tú nos lo demuestras cada día. A Oma, gracias por tus locuras y, como no, por tus sorting. A Laura, gracias por recordarme de dónde vengo, en un tiempo récord te has sabido ganar mi corazón (aunque creo que has hecho trampa, porque la sangre canaria siempre me tira...). Y a todas las viejas y nuevas incorporaciones, por todos los momentos compartidos durante estos años de tesis.

A todos los miembros de la división de biomedicina epitelial: A Fernando, a Rodolfo, a Marta Carretero, a Blanca, a Almudena, a Ángeles, a Nuria, a Marta García y a Sara Guerrero, por toda su ayuda durante esta etapa y por su interés en mi trabajo. A Cristina Chamorro, mi co-FPI CIEMAT, ¡¡Felicidades Doctora!! A las nuevas incorporaciones: A Vic, por tu constante felicidad que nos transmites a todos, sigue trabajando duro y llegarán las recompensas. A Vero, un nuevo camino se abre a tu paso y ya estás pisando fuerte, gracias por tu apoyo. A Parki, porque tu entusiasmo y tu alegría por la ciencia, el trabajo y la vida son contagiosos y un ejemplo a seguir. Pasito a Pasito. A Esteban, gracias por tus ánimos, por tu interés y por tener siempre buenas palabras para mí. Tu inteligencia, tu constancia y tu dedicación te llevarán muy lejos.

A Sole, Aurora, Mamen y Sergio, sin su trabajo todos estaríamos perdidos. Gracias por hacernos la vida un poco más fácil día a día.

A Kiko y a Pilar, por su importante labor en el laboratorio.

Porque cuando uno se va de casa, lejos de la familia y los amigos, es muy importante encontrar un lugar al que poder llamar hogar, y junto a ustedes encontré a mi segunda familia. David, Mariana y Javi ¡GRACIAS! Gracias por tanto momentos vividos a lo largo de estos 5 años, por todas las comidas en familia, por las largas noches hablando hasta al alba, por apoyarme y por compartir mis emociones y frustraciones con la ciencia aunque no tuvieran muy claro de qué estaba hablando y por vivirlos a mi lado hasta el último momento. Small Brother no será nunca lo mismo sin ustedes y no me canso de repetir lo afortunado que he sido por topar con ustedes aquel 3 de Octubre en Angelita Camarero (aunque nunca encontrara la parada del 602). Espero que pronto estemos los cuatro juntos de nuevo. También quiero agradecer a Amanda, por su apoyo y su interés, y por estar siempre dispuesta a echar una mano. En esta tesis hay una pequeña parte de todos ustedes.

A Alejandro, a Judy, a Carlos y a Micu, por haber creído siempre en mí y permanecer a mi lado. Gracias. A Héctor, empezamos juntos nuestra aventura madrileña desde el primer minuto. Ese año de mi vida lo recordaré siempre y te lo debo en gran parte a ti. El tiempo ha separado nuestros caminos pero no nuestra amistad.

A Nauzet y Ayoze, mis eternos compañeros. Por llevar 20 años aguantándome. Gracias por estar siempre ahí cuando lo he necesitado, a pesar de la distancia, para escuchar mis alegrías, mis penas y mis tonterías. Porque poner un pie en Canarias no es igual si esa noche no brindamos con una cerveza. ¡Espero poder celebrar este momento con ustedes!

A Jonay, sin ti no estaría donde estoy. Darte las gracias es quedarse corto. A lo largo de estos años nos han separado miles de kilómetros y más de un océano en varias ocasiones, pero para mí siempre has estado a la vuelta de la esquina, ofreciéndome tu ayuda incondicional. Espero seguir paseando a tu lado por Las Canteras muchos años más. Mucho ánimo con todos tus proyectos, el continuo esfuerzo merecerá la pena y tú te mereces todo lo mejor.

Gracias a toda mi familia, por su apoyo y su interés durante este periodo. Y en especial, gracias a mis padres y a mi hermana. Sin ustedes no estaría aquí. Desde el primer momento me apoyaron y animaron aunque eso supusiera irme lejos. Gracias por la constancia, la dedicación, las preocupaciones y por entenderme en todo momento, año tras año. Este logro no es solo mío, es de los cuatro.



Abreviaturas .....	1 -
Summary.....	3 -
Resumen .....	5 -
Introducción.....	7 -
1. La glándula mamaria. ....	9 -
1.1 Desarrollo de la glándula mamaria. ....	9 -
1.1.1 Desarrollo embrionario. ....	10 -
1.1.2 La pubertad. ....	10 -
1.1.3 Estadio reproductivo.....	11 -
1.2 Histología de la glándula mamaria.....	13 -
1.3 Células madre epiteliales de la glándula mamaria.....	14 -
2. El cáncer de mama.....	15 -
2.1 La biología del cáncer de mama.....	15 -
2.2 Principales alteraciones y mecanismos moleculares del cáncer de mama. ....	20 -
2.2.1 Alteraciones genómicas en los tumores de tipo luminal.....	20 -
2.2.2 Alteraciones genómicas en los tumores de tipo HER2. ....	21 -
2.2.3 Alteraciones genómicas en los tumores de tipo basal. ....	21 -
2.2.4 Transición epitelio-mesénquima. ....	22 -
2.2.5 El papel de los microARNs en cáncer de mama. ....	23 -
2.3 Modelos de ratón empleados para el estudio del cáncer de mama. ....	24 -
2.3.1 Xenoinjertos de líneas celulares, xenotrasplantes derivados de pacientes y modelos - singénicos. ....	24 -
2.3.2 Modelos de ratones modificados genéticamente en cáncer de mama. ....	25 -
3. El sistema de transposición “sleeping beauty”. ....	26 -
3.1 Aplicación del sistema de transposición “sleeping beauty” en el cáncer de mama.....	28 -
4. La vía de señalización de Ras y su implicación en cáncer.....	29 -
Objetivos.....	33 -
Materiales y métodos.....	37 -
1. Recolección de las muestras. ....	39 -
1.1 Muestras humanas. ....	39 -
1.2 Muestras de ratón. ....	39 -
1.2.1 Para el análisis histológico.....	39 -
1.2.2 Para la extracción de ARN. ....	39 -
1.2.3 Para la extracción de proteína.....	39 -
2. Líneas celulares y medios de cultivo.....	40 -
3. Plásmidos y vectores retrovirales.....	41 -
3.1 Construcción y adquisición de plásmidos. ....	41 -

3.2	Transfección de líneas celulares. ....	43 -
3.3	Generación de vectores retrovirales. ....	43 -
4.	Análisis histológico. ....	44 -
5.	Análisis inmunohistoquímico. ....	44 -
5.1	Valoración de las tinciones inmunohistoquímicas. ....	45 -
6.	Análisis mediante inmunofluorescencia. ....	46 -
6.1	Inmunofluorescencias de cultivos celulares y de muestras de tejido. ....	46 -
6.2	Inmunofluorescencias de cultivos 3D. ....	46 -
7.	Ensayos de proliferación. ....	48 -
8.	Ensayos de migración: cicatrización de heridas en placa. ....	48 -
9.	Ensayos de invasión. ....	49 -
10.	Análisis por citometría de flujo. ....	49 -
10.1	Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. ....	49 -
10.2	Análisis de marcadores de superficie mediante citometría de flujo. ....	49 -
11.	Extracción de proteínas y análisis mediante western blot. ....	50 -
12.	Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa. ....	51 -
13.	Análisis masivo de expresión génica. ....	53 -
14.	Análisis bioinformáticos. ....	53 -
15.	Experimentación animal. ....	54 -
15.1	Xenoinjertos ortotópicos en la glándula mamaria. ....	55 -
15.2	Generación de líneas de ratones transgénicos. ....	56 -
15.2.1	Superovulación de hembras donantes. ....	56 -
15.2.2	Extracción de embriones y microinyección. ....	56 -
15.2.3	Transferencia de embriones y sincronización de hembras receptoras. ....	57 -
15.3	Monitorización de la aparición de tumores espontáneos. ....	57 -
16.	Genotipado de ratones transgénicos. ....	58 -
17.	Southern blot. ....	59 -
18.	Tinción y montaje de la glándula mamaria completa ("Whole mount"). ....	59 -
19.	Análisis estadístico. ....	59 -
	<b>Resultados</b> ....	61 -
1.	Caracterización histológica y molecular de los tumores generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-.....	63 -
2.	Implicación de RASA1 en el cáncer de mama. ....	65 -

2.1	Análisis de la expresión de RASA1 y NF1 en los tumores de mama generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-.....	65 -
2.2	Alteraciones del gen RASA1 en los tumores de mama humanos. ....	68 -
2.3	Estudio de la pérdida de RASA1 en un modelo de célula epitelial mamaria normal.....	75 -
2.4	Colaboración de la pérdida de RASA1 y las mutaciones en TP53 en los tumores de mama triple negativos. ....	78 -
2.4.1	Activación del proceso de EMT e incremento de la capacidad de invasión mediada por la pérdida de RASA1 y la mutación de TP53. ....	80 -
2.4.2	La reducción en la expresión de RASA1 junto con la mutación R175H del gen TP53 induce la activación de la vía de señalización de Ras. ....	85 -
3.	Implicación de ERAS en el cáncer de mama. ....	86 -
3.1	Análisis de la expresión de ERAS en los tumores de mama generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-.....	86 -
3.2	Estudio de la función de ERAS en un modelo de célula epitelial mamaria humana normal.....	88 -
3.2.1	Estudio de la expresión de ERAS en las células MCF10A y sus cambios morfológicos. ....	88 -
3.2.2	Estudio del papel de ERAS en la proliferación y migración de las células MCF10A. ....	91 -
3.2.3	ERAS induce características de EMT y de células madre. ....	92 -
3.2.4	Principales vías de señalización de ERAS. ....	96 -
3.2.5	ERAS modula el proceso de EMT a través de la familia miR-200. ....	100 -
3.3	Estudio de la expresión de ERAS en células tumorales mamarias humanas. ....	102 -
3.4	Expresión de ERAS en tumores de mama humanos. ....	106 -
3.5	La expresión de ERAS en cáncer de mama podría estar mediada por alteraciones epigenéticas. ....	109 -
4.	Ratones transgénicos K5-ERAS: un nuevo modelo para el estudio del cáncer de mama.....	111 -
4.1	Análisis del número de copias de las líneas de ratones transgénicos K5-ERAS. ....	112 -
4.2	Análisis de la expresión de ERAS en las líneas de ratones transgénicos K5-ERAS. ....	114 -
4.1	Descripción del fenotipo de los ratones K5-ERAS. ....	116 -
4.2	Estudio del desarrollo de la glándula mamaria en los ratones K5-ERAS. ....	121 -
4.3	Estudio de los tumores espontáneos generados en los ratones K5-ERAS.....	125 -
4.3.1	Monitorización y clasificación de los tumores espontáneos.....	125 -
4.3.2	Clasificación y caracterización histopatológica de los tumores mamarios. ....	128 -
4.3.3	Clasificación histopatológica de otros tumores epiteliales. ....	132 -
4.4	Influencia de la gestación y lactación en el desarrollo de tumores mamarios en las hembras K5-ERAS.....	134 -
	Discusión.....	137 -

1. Identificación de nuevos genes implicados en cáncer de mama mediante el - sistema de transposición “sleeping beauty” .....	139 -
2. Importancia de los genes Ras-GAP en el cáncer de mama.....	140 -
3. ERAS: un nuevo oncogén en el cáncer de mama. ....	147 -
4. Ratones transgénicos K5-ERAS: un nuevo modelo para el estudio del cáncer de - mama.....	152 -
Conclusiones .....	157 -
Anexos .....	161 -
Referencias .....	167 -







## Abreviaturas -

---

<b>APC</b>	Aloficocianina (" <i>Allophycocyanin</i> ")
<b>ATCC</b>	" <i>American type culture collection</i> "
<b>CAG</b>	" <i>Cytomegalovirus enhancer, chicken beta-actin gene promoter and splice acceptor of the rabbit beta-globin gene</i> ". Elemento regulador de expresión ubicua.
<b>CDI</b>	Carcinoma ductal invasivo
<b>CIP</b>	" <i>Calf intestinal phosphatase</i> "
<b>CIS</b>	Sitio común de inserción (" <i>Common insertion site</i> ")
<b>CLI</b>	Carcinoma lobulillar invasivo
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CNA</b>	" <i>Copy number alterations</i> "
<b>Co</b>	Control
<b>COSMIC</b>	Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (" <i>Catalogue of somatic mutations in cancer</i> ")
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DMBA</b>	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
<b>DMEM</b>	" <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> "
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico (" <i>Epidermal growth factor</i> ")
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicol bis ( $\beta$ -amino etil éter) tetraacético
<b>EMT</b>	Transición epitelio-mesénquima (" <i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i> ")
<b>FDR</b>	Tasa corregida de falsos descubrimientos (" <i>False discovery rate</i> ")
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína (" <i>Fluorescein isotiocyanate</i> ")
<b>GAP</b>	Proteína activadora de GTPasas (" <i>GTPases-activating protein</i> ")
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (" <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> ")
<b>GISTIC</b>	" <i>Genomic identification of significant targets in cancer</i> "
<b>GO</b>	Ontología génica (" <i>Gene ontology</i> ")
<b>GSEA</b>	Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (" <i>Gene set enrichment analysis</i> ")
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>hCG</b>	Gonadotropina coriónica humana (" <i>Human chorionic gonadotropin</i> ")
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
<b>HPR</b>	Peroxidasa del rábano (" <i>Horseradish peroxidase</i> ")
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IRL</b>	" <i>Inverted repeat left</i> "
<b>IRR</b>	" <i>Inverted repeat right</i> "
<b>LTR</b>	" <i>Long terminal repeat</i> "
<b>miARN</b>	microARN
<b>MMTV</b>	Virus del tumor mamario del ratón (" <i>Mouse mammary tumor virus</i> ")
<b>MSCV</b>	Virus de la célula madre de ratón (" <i>Murine stem cell virus</i> ")

<b>MuLV</b>	Virus de la leucemia de ratón (" <i>Murine leukemia virus</i> ")
<b>MuMoLV</b>	Virus de la leucemia de ratón de Moloney (" <i>Murine Moloney leukemia virus</i> ")
<b>N/A</b>	No aplica
<b>ND</b>	No determinado
<b>NES</b>	Puntuación de enriquecimiento normalizado (" <i>Normalized enrichment score</i> ")
<b>ns</b>	No significativo
<b>OEBA</b>	Órgano encargado del bienestar animal
<b>pA</b>	Secuencia de poliadenilación
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (" <i>Phosphate buffered saline</i> ")
<b>PDX</b>	Xenoinjertos derivados de pacientes (" <i>Patient-derived xenograft</i> ")
<b>PE</b>	Ficoeritrina (" <i>Phycoerythrin</i> ")
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PMSG</b>	Gonadotropina sérica de yegua gestante (" <i>Pregnant mare's serum gonadotropin</i> ")
<b>RMA</b>	" <i>Robust multi-array average</i> "
<b>RMG</b>	Ratones modificados genéticamente
<b>RPKM</b>	" <i>Reads per kilobase per millon mapped reads</i> "
<b>RPPA</b>	" <i>Reverse phase protein array</i> "
<b>RT-PCR</b>	" <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> "
<b>SA</b>	Sitio aceptor de " <i>splicing</i> "
<b>SB</b>	" <i>Sleeping beauty</i> "
<b>SD</b>	Sitio donador de " <i>splicing</i> "
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>shARN</b>	" <i>Small hairpin RNA</i> "
<b>TAC</b>	" <i>Transcriptome analysis console</i> "
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tris-borato-EDTA
<b>TCGA</b>	" <i>The cancer genome atlas</i> "
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Tg</b>	Transgénico
<b>TMA</b>	" <i>Tissue microarray</i> "
<b>UDLT</b>	Unidad ducto-lobulillar terminal
<b>UTR</b>	Región no traducida (" <i>Untranslated region</i> ")

## Summary -

---

### Implication of new molecules of the Ras signaling pathway in breast cancer

#### Introduction

Breast cancer is by far the most frequent tumor type in the female population worldwide and although its mortality rate is not the highest, it is the most frequent cause of cancer death in women. Although hormone and HER2 receptors status have been traditionally used to classify breast tumors, recent genomic studies have defined several breast cancer intrinsic molecular subtypes, which are associated with different molecular alterations and distinct clinical outcome including therapeutic response. Breast cancer is a heterogeneous group of diseases and its development is triggered by a large variety of molecular mechanisms, which are variable among different individuals. For this reason, the driver genes whose alterations lead to breast tumorigenesis are only partially known. We have used a mouse model based on the sleeping beauty transposon system (a powerful tool for the identification of cancer driver genes) to identify genes involved in breast cancer development. Following this approach, we identified *Nf1*, *Rasa1* (two Ras-GAP genes) and *Eras* (a usually silent member of the Ras family), as candidate genes implicated in mammary tumorigenesis. Although Ras genes are among the most frequently mutated genes in human cancer, less than 1% of breast cancers carry mutations in classical Ras genes (*H*-, *N*-, *K*-RAS). In spite of this observation, the Ras pathway is significantly activated in some human breast tumors, especially in the triple-negative type. As Ras signaling may be activated also by activating mutations of other members of the Ras family or, notably, by inactivation of molecules that limit Ras activity, such as Ras-GAP proteins, alterations of these genes could be responsible of Ras activation in breast cancer.

#### Objective

The major aim of this project is to validate the relevance of the candidate genes that we identified (*NF1*, *RASA1* and *ERAS*) in human breast cancer, as well as the mechanisms involved in their pathogenesis.

#### Results and conclusions

Integration of transposons in *Nf1* or *Rasa1* genes disrupted the transcription of these genes, resulting in a reduced expression level of the corresponding protein and in the activation of Ras signaling. Immunohistochemical analysis of human breast tumors indicated that frequently *RASA1* is expressed at low levels (or even absent) in basal and triple negative tumors. Bioinformatic analysis of human breast tumors in the TCGA database showed that,

although *RASA1* mutations are rare, allelic loss is frequent, particularly in basal tumors and in association with mutations in the *TP53* gene. Furthermore, inactivation of *RASA1* in a non-malignant mammary epithelial cell line (MCF10A cells) resulted in the appearance of a malignant phenotype when concurrent with the expression of a mutated form of p53 (p53<sup>R175H</sup>).

On the other hand, those tumors with insertion of transposons in the 5'-upstream region of the *Eras* gene showed expression of this gene. Forced expression of *ERAS* in non-tumoral human mammary gland cells induced a process of epithelial-to-mesenchymal transition, mediated at least in part by miR-200c downregulation, and an increase in stem cells and cancer stem cell makers. In addition, *ERAS* expression in human tumorigenic mammary cells led to the generation of larger and less differentiated tumors in xenotransplant experiments, also increasing their metastatic capacity. Immunohistochemical, RT-qPCR and bioinformatic analysis of human samples showed that *ERAS* is aberrantly expressed in some breast tumors, and that this reactivation could be mediated by epigenetic mechanisms. In order to assess the role of *ERAS* over mammary tumorigenesis *in vivo*, we generated transgenic mice carrying the human *ERAS* gene under the transcriptional regulation of keratin K5 regulatory elements. These mice showed several phenotypic changes, such as hyperplasia in different tissues and alterations in mammary gland development. In addition, K5-*ERAS* mice developed epithelial tumors, mainly in the mammary gland, which were characterized by a fast and invasive growth. Interestingly, these tumors resembled morphologically and molecularly human malignant adenomyoepitheliomas, thus representing a new model to study this human pathology.

Taken together, these results highlight the causative role that both inactivating alterations in Ras-GAP genes and non-regulated activation of non-classical members of the Ras family have in breast cancer.

## Resumen -

---

### Implicación de nuevas moléculas de la vía de Ras en el cáncer de mama

#### Introducción

El cáncer de mama es el tipo de tumor más frecuente en la población femenina de todo el mundo y, aunque su tasa de mortalidad no es la más elevada, es la causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres. Aunque tradicionalmente se ha utilizado la expresión de los receptores hormonales y del receptor HER2 para clasificar los tumores de mama, diferentes estudios genómicos han definido recientemente varios subtipos moleculares intrínsecos de cáncer de mama que están asociados con diferentes alteraciones moleculares y distintos parámetros clínicos, incluyendo la respuesta terapéutica. El cáncer de mama humano es un grupo heterogéneo de enfermedades y su desarrollo está desencadenado por una amplia variedad de mecanismos moleculares que varían entre individuos. Por esta razón, los genes cuyas alteraciones dan lugar a la tumorigénesis mamaria son sólo parcialmente conocidos. Nosotros hemos empleado un modelo de ratón basado en el sistema de transposición “*sleeping beauty*” (una herramienta eficaz para la identificación de genes involucrados en cáncer) para identificar genes implicados en el desarrollo del cáncer de mama. Así, hemos identificado a *Nf1*, *Rasa1* (dos genes Ras-GAP) y a *Eras* (un miembro de la familia Ras raramente expresado), como genes candidatos implicados directamente en tumorigénesis mamaria. Aunque los genes de la familia Ras son algunos de los mutados más frecuentemente en los tumores humanos, menos del 1% de los tumores de mama tienen mutaciones en los genes Ras clásicos (*H*-, *N*-, *K*-RAS). A pesar de esto, la vía de Ras está significativamente activada en algunos tumores de mama humanos, especialmente en los tumores triple negativos. Ya que la vía de señalización de Ras también puede ser activada por otros miembros de la familia Ras o por la inactivación de moléculas que limitan la actividad de Ras, como las proteínas Ras-GAP, algunas alteraciones de estos genes podrían ser responsables de la activación de la vía de Ras en los tumores mamarios.

#### Objetivo

El objetivo principal de este proyecto es validar la relevancia de los genes candidatos que hemos identificado (*NF1*, *RASA1* y *ERAS*) en el cáncer de mama humano, así como los mecanismos implicados en su patogénesis.

## Resultados y conclusiones

En nuestro modelo de ratón, la integración de los transposones en *Nf1* y *Rasa1* condujo a la interrupción de la transcripción de estos genes, lo que resultó en una reducción de la expresión de la proteína y la activación de la vía de señalización de Ras. El análisis inmunohistoquímico de tumores de mama humanos confirmó que la expresión reducida o nula de RASA1 es frecuente en los tumores de tipo basal y en los tumores triple negativos. Asimismo, el análisis bioinformático de tumores de mama humanos a partir de la base de datos TCGA mostró que, aunque las mutaciones en el gen *RASA1* son raras, su pérdida alélica es frecuente, particularmente en los tumores de tipo basal y en asociación con mutaciones en el gen *TP53*. Además, la inactivación de *RASA1* en una línea de células epiteliales mamarias no malignas dio como resultado la aparición de un fenotipo maligno cuando se combinó con la expresión de una forma mutada de p53 (p53<sup>R175H</sup>).

Por otra parte, la inserción de los transposones en la región 5' del gen *Eras* dio lugar a su expresión en los tumores generados mediante transposición. La expresión forzada de *ERAS* en células epiteliales mamarias humanas no tumorales indujo la activación del proceso de transición epitelio-mesénquima, mediado al menos en parte por la represión de miR-200c, y un aumento en los marcadores de célula madre y de célula madre del cáncer. Además, en experimentos de xenoinjertos en ratones inmunodeficientes, la expresión de *ERAS* en células tumorales mamarias humanas condujo a la generación de tumores de mayor tamaño y menos diferenciados, promoviendo su capacidad metastásica. El análisis inmunohistoquímico, la RT-PCR cuantitativa y el análisis bioinformático de muestras humanas mostraron que *ERAS* se expresa de forma aberrante en algunos tumores de mama, y que esta reactivación podría estar mediada por mecanismos epigenéticos. Para evaluar el papel de *ERAS* sobre la tumorigénesis mamaria en un sistema *in vivo*, hemos generado ratones transgénicos que portaban el gen humano *ERAS* bajo el control de elementos reguladores de la queratina K5. Estos ratones mostraron varios cambios fenotípicos, como hiperplasia en diferentes tejidos y alteraciones en el desarrollo de la glándula mamaria. Además, los ratones K5-*ERAS* desarrollaron tumores epiteliales, principalmente en la glándula mamaria, los cuales se caracterizaron por un crecimiento rápido e invasivo. Estos tumores se asemejan morfológicamente y molecularmente a los adenomioepiteliomas malignos humanos, representando por tanto un nuevo modelo para el estudio de esta patología humana.

En su conjunto, estos resultados destacan el papel causal de las alteraciones en los genes Ras-GAP y de la activación no regulada de otros miembros de la familia Ras en el cáncer de mama humano.

## ***Introducción -***

---

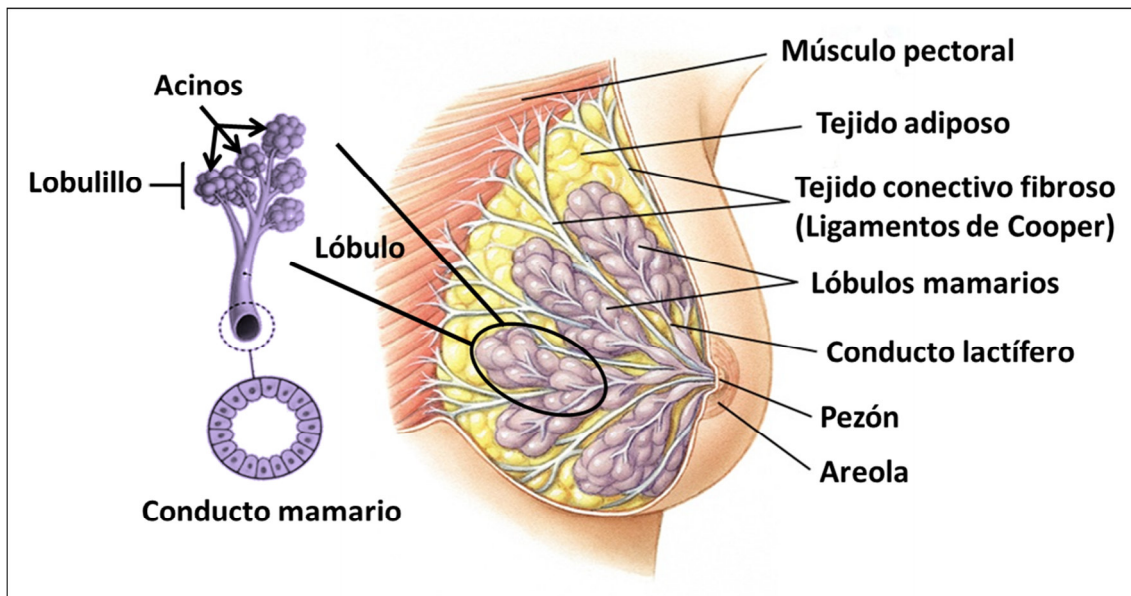




## Introducción -

### 1. La glándula mamaria.

La glándula mamaria es un órgano único de los mamíferos cuya función es sintetizar y secretar leche al recién nacido para su óptima alimentación, protección y desarrollo. Este órgano está compuesto de un tejido glandular sustentado por adipocitos y una red de tejido conectivo fibroso denominada ligamentos de Cooper. El tejido glandular está conectado mediante un sistema ductal que almacena y transporta la leche hasta el pezón durante la gestación y posterior lactación. Este sistema ductal está dividido en lóbulos que, a su vez, están compuestos por lobulillos, estando estos formados por un conjunto de acinos o alveolos (Figura 1) (revisado en <sup>1,2</sup>).



**Figura 1.** Anatomía de la glándula mamaria.

#### 1.1 Desarrollo de la glándula mamaria.

El desarrollo completo de la glándula mamaria es un proceso complejo en el cual acontecen múltiples cambios durante toda la vida de la mujer. Este proceso puede dividirse en tres estadios principales: el desarrollo embrionario, la pubertad y el estadio reproductivo, comprendiendo este último las fases de gestación, lactación e involución.

### 1.1.1 Desarrollo embrionario.

En la glándula mamaria se distinguen principalmente dos compartimentos celulares: el epitelial y el estroma subyacente. Estos compartimentos derivan de diferentes hojas germinales, teniendo un origen ectodérmico y mesodérmico, respectivamente. El desarrollo embrionario de la mama se inicia en torno a la sexta semana de gestación mediante la formación de unas delgadas crestas ectodérmicas bilaterales, que se extienden longitudinalmente desde el esbozo del miembro anterior hasta el esbozo del miembro posterior, dando lugar a las denominadas líneas lactíferas. Durante las dos semanas posteriores, el parénquima mamario invade el estroma subyacente originando una elevación del ectodermo denominada cresta mamaria, que será el origen de la futura glándula. La señalización procedente de este tejido estromal es esencial para la correcta diferenciación del epitelio mamario, siendo la activación temprana de la vía de Wnt un punto crítico en este proceso.

Tras la formación de la cresta mamaria, se produce una expansión del tejido ectodérmico, descendiendo dentro del mesénquima dando lugar a una estructura esférica, a partir de la cual se extienden varios cordones sólidos de células epiteliales que formarán el esbozo mamario. Antes de que el desarrollo embrionario concluya, tienen lugar dos procesos morfológicos adicionales: la formación del lumen ductal y la generación del pezón. Aunque se desconoce con exactitud los mecanismos por los cuales se forma el espacio luminal de la glándula mamaria, tres procesos han sido implicados principalmente: la apoptosis, la autofagia y la remodelación celular. Por otro lado, la generación del pezón ocurre mediante modificaciones de la piel, como el engrosamiento de la epidermis y la supresión de folículos pilosos. La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (*PTH1R*), producida por el epitelio mamario, juega un papel central en la regulación de la expansión del epitelio y en la formación del pezón. Para poder llevar a cabo su función, la *PTH1R* se une al receptor *PTH1R* del estroma mamario, reforzando la importancia de la interacción epitelio-mesénquima en la regulación de todos estos procesos (revisado en <sup>1-4</sup>).

### 1.1.2 La pubertad.

En el momento del nacimiento, la glándula mamaria es solo un rudimentario sistema ductal que experimenta un crecimiento muy moderado hasta la pubertad. En este estadio tiene lugar una proliferación expansiva del epitelio, ocupando gran parte del estroma, mediada por el efecto de hormonas y factores de crecimiento. En los extremos de los ductos se originan yemas terminales que proliferan y se expanden penetrando en el estroma, dando lugar a los

conductos principales. De los conductos principales emergen ramificaciones laterales, las cuales dan lugar a conductos terminales, formando así las unidades ducto-lobulillares terminales (UDLT). Las UDLT están compuestas por numerosas terminaciones en fondo de saco ciego denominadas acinos o alveolos, que culminarán su desarrollo durante las fases de gestación y lactación.

Un importante regulador de este estadio es la hormona del crecimiento (GH) o somatotropina, la cual es secretada por las células somatotropas de la adenohipófisis, y ejerce su función sobre el receptor de la hormona del crecimiento (GHR). En la glándula mamaria, el GHR se expresa en los fibroblastos del estroma y su activación induce la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF1), actuando de manera paracrina sobre el epitelio mamario y promoviendo así su expansión. Por otro lado, los estrógenos (liberados principalmente por los ovarios) actúan, conjuntamente con el IGF1, favoreciendo el progreso de la morfogénesis ductal. El receptor de estrógenos alfa (ESR1) se expresa en un subconjunto de células epiteliales mamarias y su activación induce la liberación de anfiregulina (AREG). La AREG es una proteína transmembrana que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de las células estromales, induciendo la producción de factores de crecimiento fibroblásticos y estimulando la proliferación de las células epiteliales (revisado en<sup>1,2</sup>).

### **1.1.3 Estadio reproductivo.**

Durante la gestación, la glándula mamaria experimenta numerosos cambios precedentes a la lactación, teniendo lugar un importante aumento de ramificaciones ductales secundarias y terciarias, seguido de la maduración de la glándula y de la alveologénesis (o morfogénesis alveolar). La morfogénesis alveolar comienza con un aumento de la proliferación de las células acinares, inducida por el incremento de los niveles séricos de progesterona y prolactina, formándose así estructuras esféricas constituidas por una única capa de células epiteliales polarizadas que engloban un lumen circular. Este proceso lleva a un aumento de la superficie epitelial que es esencial para la producción y secreción de leche durante la lactación.

El efecto sinérgico entre la progesterona y la prolactina es fundamental para que este proceso sea llevado a cabo correctamente. La prolactina, liberada por la adenohipófisis, estimula la producción ovárica de progesterona, manteniendo los niveles requeridos durante las fases tempranas de la gestación. Al igual que el receptor de estrógenos, la expresión del receptor de progesterona (PGR) en un subconjunto de células epiteliales mamarias (y no en el estroma) es fundamental para la proliferación en esta fase, llevando a cabo su función de

manera paracrina. Wnt4 y RankL desempeñan el papel de factores paracrinos responsables de la proliferación de las células epiteliales durante las primeras fases de la gestación. RankL activa NF- $\kappa$ B a través de IKK $\alpha$ , promoviendo así la transcripción de la ciclina D1 (*CCND1*) y, con ello, la proliferación de las células epiteliales. Por lo tanto, la producción de progesterona conduce a la activación de la vía RankL/NF- $\kappa$ B/Ccnd1, siendo crucial para el desarrollo alveolar durante la gestación.

La prolactina es la principal hormona implicada en el mantenimiento de la producción láctea y ejerce su función mediante su unión al receptor de prolactina (PRLR), activando diversas vías de señalización. Al igual que la progesterona, la prolactina también regula Wnt4 y la vía RankL/NF- $\kappa$ B/Ccnd1. Estos ejes actúan como puntos de unión entre las vías de la progesterona y la prolactina, evidenciando, una vez más, su cooperación durante la alveologénesis. Además, la prolactina es capaz de señalar a través de otras vías, como la de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), la de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía PRLR/JAK2/STAT5, siendo esta última esencial para la transcripción de múltiples genes involucrados en diversos procesos que tienen lugar durante la morfogénesis alveolar, como la interacción entre las células epiteliales, su relación con el estroma, la polaridad de las células epiteliales y la expresión de proteínas específicas de la leche (como la caseína beta y la proteína WAP).

El final de la lactación está marcado por la estasis láctea en el epitelio mamario, debida a la falta de demanda por parte del lactante, iniciando así el proceso de involución de la glándula mamaria. La involución consiste en la eliminación de las células productoras de leche, con la consiguiente remodelación del árbol ductal, regresando a la arquitectura previa a la gestación. Este proceso ha sido dividido en dos fases:

La primera fase es reversible y se caracteriza por un proceso apoptótico, dando lugar a la separación de las células alveolares y su acumulación en el lumen del alveolo. La familia de las proteínas STAT juega un papel muy importante en esta fase inicial que regula el cambio de la lactación a la involución, modulando señales de supervivencia celular a través de la vía de señalización PI3K/AKT. Durante la lactación, STAT5A y STAT5B activan AKT, de forma prolactina-dependiente, promoviendo así la supervivencia celular. Cuando la estasis láctea tiene lugar, las proteínas STAT5 son inactivadas y se activa STAT3, el cual inhibe la señalización de AKT y promueve la apoptosis.

En la segunda fase se producen cambios irreversibles en la arquitectura de la glándula, incluyendo la remodelación de la glándula, el colapso de los alveolos y la eliminación de la

mayor parte del epitelio secretor, siendo sustituido por adipocitos. Los principales reguladores de este proceso son las serina proteasas (como la plasmina) y las metaloproteinasas de la matriz extracelular, siendo responsables de la pérdida de interacción entre las células epiteliales, la membrana basal y la matriz extracelular. La eliminación de las células epiteliales apoptóticas está mediada por un proceso de fagocitosis llevado a cabo por macrófagos que llegan al epitelio mamario. La expresión de Rac1 en las células epiteliales es esencial para que el proceso de fagocitosis tenga lugar y, por lo tanto, para la remodelación del tejido. (revisado en <sup>1-3,5,6</sup>).

## 1.2 Histología de la glándula mamaria.

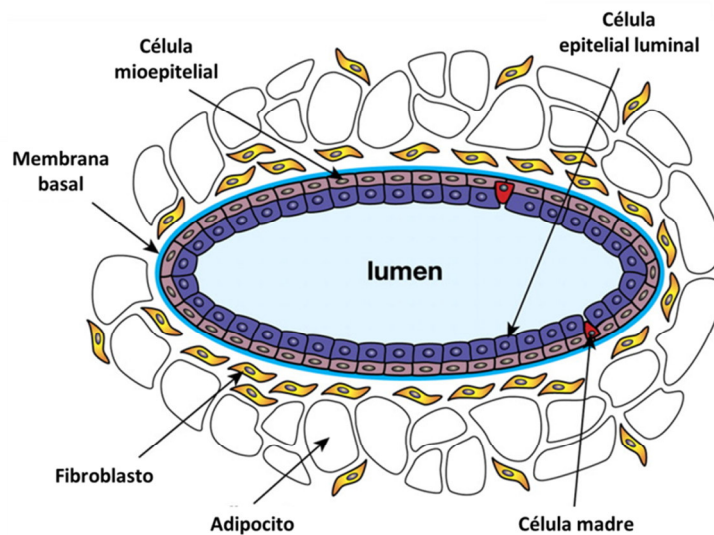
La glándula mamaria está compuesta por múltiples tipos celulares, siendo todos ellos de vital importancia en su desarrollo, estructura y funcionamiento. Sin embargo, las células epiteliales son las que llevan a cabo la función primordial de este órgano, la producción y distribución de la leche. El sistema ductal mamario está compuesto esencialmente por dos tipos de células epiteliales: las células epiteliales luminales y las células mioepiteliales basales.

Las células epiteliales luminales conforman la capa interna de todo el árbol mamario. Son células polarizadas que presentan una morfología cilíndrica en los conductos principales, transformándose en un epitelio simple cúbico en los conductos terminales y en los alveolos (**Figura 2**). Durante la lactación, las células luminales de los alveolos, también denominadas lactocitos, secretan al lumen glóbulos grasos de forma apocrina, junto con microvesículas que contienen lactosa y proteínas de la leche<sup>3,7</sup>.

Las células mioepiteliales están en contacto directo con la membrana basal y contribuyen significativamente a la producción de la misma mediante la deposición de fibronectina, colágeno IV, nidógeno y lamininas. Estas células forman una capa externa que reviste a las células epiteliales a lo largo de todo el sistema ductal (**Figura 2**); en los ductos constituyen una capa continua de células fusiformes orientadas de forma paralela a su eje longitudinal, mientras que en las UDLT presentan una morfología estrellada, conformando una capa discontinua que permite el contacto directo de las células luminales con la membrana basal. Las células mioepiteliales son contráctiles (debido principalmente a la presencia de filamentos de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA)) y sensibles a la oxitocina. Esta hormona produce la contracción activa de las células mioepiteliales y, con ello, la secreción de la leche por parte de los lactocitos al interior del lumen y la distribución de la leche por el sistema ductal hasta el pezón. Además, las células mioepiteliales juegan un importante papel en el mantenimiento de

la polaridad de las células luminales, contribuyendo así a conservar la integridad de la glándula mamaria<sup>3,7,8</sup>.

Varios estudios han demostrado que cada linaje de células epiteliales adquiere un patrón de expresión específico y diferencial de queratinas a lo largo del desarrollo de la glándula mamaria. En general, se considera que en tejidos adultos, las células luminales mamarias, tanto ductales como alveolares, expresan preferentemente las queratinas K8 y K18, mientras que las células mioepiteliales se caracterizan por la expresión de las queratinas K5 y K14<sup>9,10</sup>. No obstante, aunque parece que este patrón de expresión es claro en ratones, en humanos también se ha observado expresión de las queratinas K5 y K14 en las células luminales de los lóbulos mamarios<sup>11</sup>.



**Figura 2.** Representación esquemática de la histología de un conducto terminal de la glándula mamaria. (Modificado de Jane E. Visvader; Genes Dev. 2009<sup>12</sup>).

El estroma de la glándula mamaria está formado por fibroblastos, adipocitos, tejido vascular y linfático y células inmunes, además de cantidades variables de colágeno (**Figura 2**). En su conjunto, contribuyen a la producción y remodelación de la matriz extracelular y dan aporte energético, siendo fundamentales para el metabolismo y desarrollo de la glándula<sup>3,7</sup>.

### 1.3 Células madre epiteliales de la glándula mamaria.

El gran potencial regenerativo de la glándula mamaria y su capacidad para experimentar numerosos ciclos de crecimiento e involución, indican la existencia de células madre epiteliales en el tejido adulto, capaces de regenerar por completo el epitelio mamario. Se han identificado subconjuntos celulares con características de células madre basados en perfiles de marcadores de superficie. Estos estudios de linaje han determinado la existencia de células

madre bipotentes (las cuales expresan las queratinas K5 y K14) con capacidad de auto-renovación que, además, dan lugar a progenitores luminales y mioepiteliales<sup>3,13-15</sup>. La subpoblación  $\text{Lin}^- \text{CD49}^+ \text{EpCam}^{-/\text{low}}$  ha demostrado poseer dicha capacidad, pudiendo regenerar estructuras mamarias diferenciadas cuando es trasplantada en ratones. Cabe destacar que, aunque el perfil de marcadores de superficie difiere entre humanos y ratones (siendo  $\text{Lin}^- \text{CD49}^{\text{hi}} \text{CD29}^{\text{hi}} \text{CD24}^+ \text{Sca1}^-$  en ratones), existe una elevada homología de genes y vías de señalización activas entre ambas especies, sugiriendo que el uso de modelos de ratón es una buena aproximación para el estudio del desarrollo de la glándula mamaria y las células madre<sup>16-18</sup>.

Además de su papel en el desarrollo y mantenimiento de la glándula mamaria, las células madre epiteliales han sido relacionadas con el cáncer de mama. Existe cierta controversia en relación a este punto, postulándose dos opciones potenciales: (a) los tumores pueden originarse a partir de células madre, dado que su prolongado estado de quiescencia permite la acumulación de mutaciones; o (b) el proceso de tumorigénesis confiere a determinadas células características de células madre, promoviendo así la progresión y malignidad del tumor<sup>3,19</sup>.

Al-Hajj y colaboradores demostraron que las células  $\text{Lin}^- \text{CD44}^{\text{hi}} \text{CD24}^{-/\text{low}}$  aisladas a partir de carcinomas mamarios humanos presentan características de células madre, mostrando una elevada capacidad de auto-renovación y reproduciendo la heterogeneidad celular observada en los tumores de origen<sup>20</sup>. Además, esta subpoblación exhibe marcadores de células mesenquimales y un fenotipo invasivo<sup>21</sup>. Aparte de los marcadores de superficie, se han desarrollado otros métodos para la identificación de células madre mamarias tanto en tejido normal como en tumores, como por ejemplo, la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1). La combinación de la actividad de la ALDH1 con el perfil de expresión de CD44 y CD24 ( $\text{Lin}^- \text{ALDH1}^+ \text{CD44}^{\text{hi}} \text{CD24}^{-/\text{low}}$ ) ha permitido refinar la fracción celular con propiedades de célula madre, demostrando que existe heterogeneidad dentro de la subpoblación  $\text{Lin}^- \text{CD44}^{\text{hi}} \text{CD24}^{-/\text{low}}$ <sup>22</sup>.

## 2. El cáncer de mama.

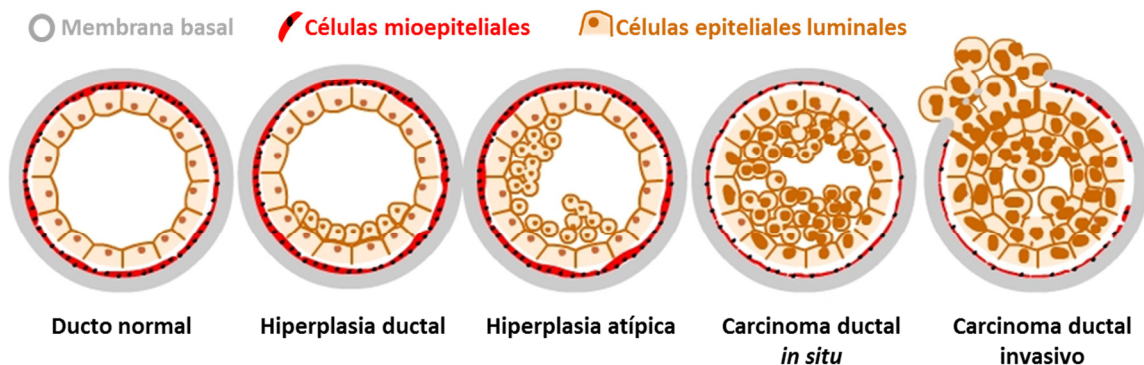
### 2.1 La biología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo y el más frecuente entre las mujeres, con 1,67 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012, es decir, el 11,9% respecto a todos los casos de cáncer, y el 25,2% respecto a los casos en mujeres. Aproximadamente, se estima que una de cada ocho mujeres padecerá cáncer de



mama a lo largo de su vida. Los países menos desarrollados presentan una incidencia ligeramente mayor que los países desarrollados, suponiendo la causa más frecuente de muerte por cáncer entre las mujeres (14,3% del total), mientras que en los países desarrollados ocupa el segundo puesto (15,4% del total), tan solo por detrás del cáncer de pulmón<sup>23,24</sup>. Por otro lado, el cáncer de mama en hombres es una patología realmente rara representando menos del 1% de todos los casos.

El cáncer de mama se origina principalmente a partir de células epiteliales, siendo raros aquellos tumores procedentes de otros tipos celulares. Eventos transformantes iniciales, como las alteraciones genéticas y epigenéticas, desencadenan la proliferación celular y la progresión tumoral, llevando a la acumulación de cambios genéticos adicionales. La hiperproliferación de las células epiteliales ductales o alveolares lleva a la aparición de carcinomas *in situ*, que pueden evolucionar a carcinomas invasivos (que destruyen la membrana basal de las estructuras glandulares e invaden el tejido mamario) (**Figura 3**). Sin embargo, la principal causa de muerte del cáncer de mama es la metástasis. En humanos, los carcinomas mamarios metastatizan frecuentemente a nódulos linfáticos regionales, pero también a órganos distales, siendo sus principales dianas el pulmón, el hígado y el tejido óseo<sup>25,26</sup>.



**Figura 3.** Representación esquemática del desarrollo del cáncer de mama.

El cáncer de mama puede clasificarse en subtipos atendiendo a su morfología histológica. El 85-90% de los carcinomas *in situ* o invasivos se originan en células ductales, siendo minoritarios los carcinomas lobulillares (10-15%). Los carcinomas ductales *in situ* han sido clasificados tradicionalmente en base a su arquitectura histológica, dividiéndose en cinco subtipos: comedocarcinomas, carcinomas cribiformes, micropapilares, papilares y sólidos. Por otro lado, los carcinomas invasivos se clasifican histológicamente como carcinomas ductales invasivos (CDI), carcinomas lobulillares invasivos (CLI), ducto-lobulillares, mucinosos, tubulares, medulares y papilares. El CDI es el subtipo mayoritario, representando el 70-80% de todas las lesiones invasivas. Además, los CDI pueden subclasificarse según su grado de malignidad

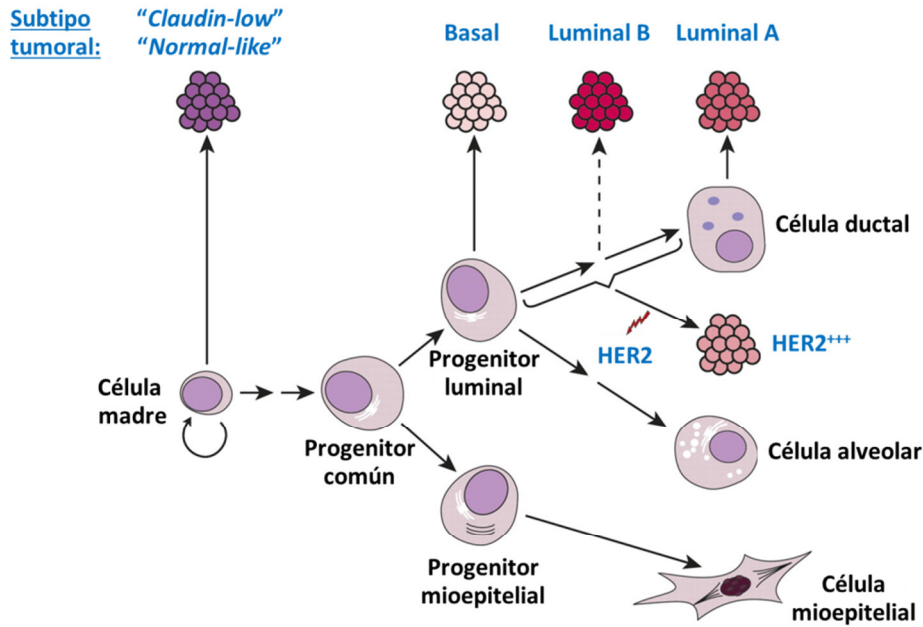
histológica en bien diferenciados (grado 1), moderadamente diferenciados (grado 2) y pobremente diferenciados (grado 3)<sup>27</sup>.

Sin embargo, aunque esta clasificación ha sido ampliamente utilizada durante décadas, no ofrece información pronóstica probada. Por esta razón, la búsqueda de marcadores moleculares con potencial pronóstico era y sigue siendo de vital importancia. Marcadores como el receptor de estrógenos (ESR1), el receptor de progesterona (PGR), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/ERBB2/Neu) y el marcador de proliferación celular Ki-67, han permitido estratificar los carcinomas invasivos en subtipos de utilidad clínica<sup>27</sup> (**Tabla 1**):

Subtipo	Expresión de marcadores	Prevalencia aproximada
Luminal A	ESR1+ y/o PGR+, HER2-, baja expresión de Ki-67	40-45%
Luminal B	ESR1+ y/o PGR+, HER2+ (o HER2- con alta expresión de Ki-67)	15-20%
HER2	ESR1-, PGR-, HER2+	10-15%
Triple negativo (o de tipo basal)	ESR1-, PGR-, HER2- (KRT5/6+ o EGFR+)	15-20%

**Tabla 1.** Clasificación molecular del cáncer de mama.

Asimismo, estudios basados en perfiles de expresión génica mediante agrupación jerárquica no supervisada de “*microarrays*” de ADN, han establecido y confirmado varios subtipos moleculares de cáncer de mama: luminal A, luminal B, HER2, subtipo basal (o “*basal-like*”), subtipo normal (o “*normal-like*”) y subtipo “*claudin-low*”<sup>28-32</sup>. Además, existe la hipótesis de que los distintos subtipos moleculares del cáncer de mama pueden estar asociados con los diferentes estadios de desarrollo de la célula epitelial. Esta hipótesis sugiere que las células madre mamarias y los progenitores luminales son las células de origen de los tumores “*claudin-low*” y de tipo basal, respectivamente. Los tumores de tipo HER2 y de tipo luminal se originarían a partir de células que han perdido sus características basales, ganando propiedades luminales<sup>12,33</sup> (**Figura 4**).



**Figura 4.** Modelo esquemático de la jerarquía celular epitelial de la glándula mamaria humana y su posible relación con los subtipos del cáncer de mama. (Modificado de Jane E. Visvader; Genes Dev. 2009<sup>12</sup>).

Estos subtipos moleculares han demostrado ser de gran utilidad en la práctica clínica, permitiendo estratificar a los pacientes en base a su supervivencia (global o libre de enfermedad) y proporcionando tratamientos más específicos para cada subtipo. Sin embargo, el empleo rutinario de los perfiles de expresión génica como técnica diagnóstica presenta dos inconvenientes principales: el coste del procedimiento y el requerimiento de muestras congeladas. Para solventar estos problemas, se han desarrollado métodos alternativos mediante el uso de sistemas de análisis más económicos (como la RT-PCR cuantitativa) y ARN extraído de muestras fijadas y embebidas en parafina. Un ejemplo de ello es la firma génica establecida por Parker *et al.*, la cual está basada en la expresión de 50 genes (denominada PAM50) capaz de estratificar los tumores dentro de los distintos subtipos moleculares<sup>34</sup>. Esta firma ha sido aprobada por la FDA (*"US Food and Drug Administration"*) para su uso clínico, permitiendo predecir el pronóstico y la respuesta clínica entre los pacientes con cáncer mamario<sup>35</sup>.

Los subtipos luminal A y luminal B representan aproximadamente el 65% de los carcinomas invasivos y son los subtipos con el pronóstico más favorable, sin embargo, existen ciertas diferencias entre ambos subtipos. Por lo general, los tumores luminal A muestran unos niveles de expresión de receptores hormonales más elevados que los de tipo luminal B, siendo además tumores de bajo grado de malignidad. Por el contrario, los tumores luminal B muestran un grado histológico moderado o intermedio, presentando frecuentemente una mayor tasa de proliferación, un comportamiento clínico más agresivo y peor pronosis que los

tumores luminal A<sup>36</sup>. Dada su expresión y actividad de receptores hormonales, principalmente ESR1, los tumores de tipo luminal son tratados con terapias endocrinas para bloquear la actividad de ESR1, incluyendo moduladores selectivos y antagonistas de ESR1 (como el tamoxifeno y el fulvestrant, respectivamente) e inhibidores de aromatasas (como el anastrozol o el letrozol)<sup>37</sup>.

La proteína HER2 es un miembro de la familia EGFR de receptores tirosina quinasa y su sobreexpresión resulta en tumores agresivos de alto grado, con mal pronóstico y un mayor riesgo de progresión de la enfermedad<sup>38,39</sup>. Sin embargo, actualmente el pronóstico del cáncer de mama subtipo HER2 es más favorable dado la existencia de tratamientos dirigidos contra esta diana molecular (por ejemplo, inhibidores como el lapatinib o el neratinib, o anticuerpos monoclonales como el trastuzumab o el pertuzumab)<sup>40</sup>.

Por otro lado, casi todos los tumores de tipo basal son ESR1 negativos (~ 95%) y presentan un alto grado histológico de malignidad y una elevada tasa de mortalidad, debido principalmente a la falta de dianas terapéuticas. Por lo tanto, la terapia actual de este subtipo tumoral está basada en la quimioterapia convencional. La mayoría de los tumores triple negativos (ESR1-, PGR- y HER2-) están englobados dentro del subtipo basal, sin embargo, este subtipo es muy heterogéneo, pudiendo subdividirse en grupos adicionales<sup>41</sup>. Además, estos tumores presentan una proporción elevada de alteraciones genómicas, incluyendo la presencia de un gran número de mutaciones y cambios en el número de copias<sup>42</sup>.

Cabe destacar que la clasificación taxonómica del cáncer de mama es un campo abierto y dinámico en continua evolución y que el estudio de un mayor número de tumores ha permitido establecer otras clasificaciones que pueden ofrecer ciertas ventajas con respecto a las anteriores. El consorcio internacional de taxonomía molecular del cáncer de mama (METABRIC) ha establecido una nueva clasificación basada en los perfiles de expresión génica junto con las alteraciones en el número de copias de más de 2.000 tumores diferentes. Esta clasificación comprende 10 nuevos grupos (*"integrative clusters"*), los cuales se denominan IntClust y se numeran del 1 al 10<sup>43,44</sup>. Por otro lado, los perfiles de metilación también han permitido identificar 5 grupos distintivos de cáncer de mama<sup>45</sup>. A pesar de esto, a lo largo de esta tesis nos vamos a centrar en las clasificaciones basadas en los marcadores moleculares y/o perfiles de expresión génica por ser las más ampliamente estudiadas hasta el momento.

## 2.2 Principales alteraciones y mecanismos moleculares del cáncer de mama.

Los tumores mamarios surgen a partir de la combinación de múltiples alteraciones genómicas adquiridas, entre las que se encuentran las mutaciones y las variaciones en el número de copias y en la metilación del ADN. Este conjunto de alteraciones conduce a la ganancia o pérdida de función de genes codificantes (oncogenes y genes supresores de tumores) y ARNs reguladores (como los microARNs o los lncARNs) implicados en los mecanismos de desarrollo y progresión del cáncer (genes conductores o “drivers”). Asimismo, hay un gran número de alteraciones en genes que no son importantes para el desarrollo del cáncer (genes pasajeros o “passengers”). El amplio número de mutaciones y alteraciones génicas presentes en los tumores mamarios dificulta la identificación de genes “driver”, lo que es de vital importancia sobre todo en aquellos tipos tumorales que no tienen una terapia específica dirigida<sup>46</sup>. Además, estos cambios genéticos y epigenéticos difieren entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama, recalcando una vez más la heterogeneidad de esta enfermedad. A continuación se describen las alteraciones genómicas más estudiadas hasta el momento en los diferentes subtipos, incluyendo mutaciones, alteración del número de copias y activación o inhibición de vías de señalización.

### 2.2.1 Alteraciones genómicas en los tumores de tipo luminal.

Los tumores de tipo luminal son los más heterogéneos en términos de expresión génica, espectro de mutaciones, alteraciones en el número de copias y respuesta de los pacientes. Estos tumores muestran un perfil de expresión similar al de las células epiteliales lumbales, sobreexpresando genes como *ESR1*, *GATA3*, *FOXA1*, *XBP1* y *cMYB*. Las mutaciones en *ESR1* y *XBP1* son infrecuentes, mientras que el gen *GATA3* está mutado en un 15% de los tumores<sup>45</sup>.

El gen *PIK3CA*, que codifica la subunidad catalítica (p110 $\alpha$ ) del heterodímero PI3K, es el gen con el mayor número de mutaciones en este grupo, siendo más frecuentes en el subtipo luminal A que en el luminal B (45% y 29% respectivamente). Sin embargo, parece que estas mutaciones no están asociadas con la activación de marcadores de la vía clásica de *PIK3CA* (como AKT, S6 y 4EBP1), sugiriendo una función diferente de este gen en estos tumores. Otros genes frecuentemente mutados son *MAP3K1* y *MAP2K4*, miembros de la vía de señalización de p38/JNK1<sup>45</sup>.

Las mutaciones en el gen supresor tumoral *TP53* son más frecuentes en los tumores de tipo luminal B (29%) que en los de tipo luminal A (12%), predominando en ambos casos las mutaciones con cambio de sentido (“missense mutations”). Estudios funcionales han

demostrado que la vía de señalización de p53 permanece activa en la mayoría de los tumores del subtipo luminal A. Sin embargo, en los tumores luminal B esta vía suele estar inactiva, induciendo la activación transcripcional de *cMYC* y *FOXM1* y, con ello, la proliferación. Otro evento oncogénico común en estos tumores, y en especial dentro del subtipo luminal B, es la amplificación y sobreexpresión del gen *CCND1*. Este gen codifica la ciclina D1, un regulador del ciclo celular que controla la progresión de la fase G1 a la fase S<sup>45</sup>.

Aunque los CLI son predominantemente clasificados como tumores luminal A (~95%), presentan ciertas diferencias notables con respecto a los CDI. Los CLI tienen un alto porcentaje de mutaciones en el gen que codifica la cadherina-E, *CDH1*. Los genes *TBX3* y *FOXA1* también se encuentran mutados con mayor frecuencia que en los CDI, sin embargo, las mutaciones en *GATA3* tienen una menor incidencia en estos tumores. Finalmente, las alteraciones en el gen supresor tumoral *PTEN*, incluyendo la pérdida homocigótica y las mutaciones, son más frecuentes en los CLI<sup>47</sup>.

### 2.2.2 Alteraciones genómicas en los tumores de tipo HER2.

La principal alteración genómica de este subtipo es la amplificación (~80%) y sobreexpresión del gen *ERBB2*, que codifica la proteína HER2 y da nombre a este grupo de tumores. Aunque en menor medida que los tumores de tipo luminal, los tumores HER2 también muestran una elevada frecuencia de mutaciones en *PIK3CA* (39%) y, además, un pequeño porcentaje presenta mutaciones en el gen *PIK3R1* (4%), el cual codifica subunidades reguladoras de PI3K. Por el contrario, la frecuencia de las mutaciones en *TP53* es mayor (72%). La activación de SRC y S6 o la amplificación de los genes *CDK4* y *CCND1* son eventos comunes en este subtipo tumoral. Sin embargo, cierto porcentaje de los tumores positivos para HER2 mediante el uso de técnicas convencionales muestran un perfil de expresión génica de tipo luminal, sobreexpresando *ESR1* y *GATA3*<sup>45</sup>.

### 2.2.3 Alteraciones genómicas en los tumores de tipo basal.

Aunque los tumores de tipo luminal presentan un mayor espectro de mutaciones, los tumores de tipo basal tienen la mayor tasa de mutaciones, siendo el subtipo con mayor inestabilidad genómica. La mayoría de los tumores basales son triple negativos, caracterizándose además por la expresión de marcadores como las queratinas K5, K6, K14 y K17, y la elevada expresión de genes asociados con la proliferación celular (como *FOXM1* y *cMYC*)<sup>42,45</sup>.

Los tumores de tipo basal muestran la frecuencia más elevada de mutaciones en *TP53* (80%), siendo mayoritariamente mutaciones sin sentido (“*nonsense mutations*”) y mutaciones con desplazamiento del marco de lectura (“*frameshift mutations*”). Además, otras alteraciones como la pérdida de *ATM* y la amplificación de *MDM2* interfieren en la señalización de p53, resultando en una pérdida de función de esta vía en casi todos los tumores de tipo basal. Por otro lado, la pérdida del gen del retinoblastoma (*RB1*) y la amplificación de la ciclina E1 (*CCNE1*) son eventos comunes en este subconjunto de tumores, contribuyendo a promover la proliferación y malignidad de los tumores<sup>45</sup>.

Las mutaciones en *PIK3CA* son frecuentes en estos tumores, pero con una incidencia muy inferior respecto al resto de subtipos (~9%). Sin embargo, casi el 50% de los tumores presentan amplificación de este gen. Es interesante señalar que los tumores de subtipo basal, a diferencia de los luminales, muestran una elevada activación de la vía PI3K/AKT. Esto podría deberse parcialmente a la amplificación de *PIK3CA* y/o a la frecuente pérdida de *PTEN*. Asimismo, muchos de los genes implicados en la vía de señalización de las MAP quinasas se encuentran amplificados, pero no mutados, en los tumores basales, incluyendo *KRAS* (32%), *BRAF* (30%) y *EGFR* (23%)<sup>45</sup>.

Las mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* están asociadas al cáncer de mama de tipo basal o triple negativo, estando presente en un 20% de estos tumores. Ambos genes actúan como supresores tumorales, detectando y reparando daños en el ADN, desempeñando un papel fundamental en la reparación de roturas de doble cadena. Se han identificado cientos de mutaciones en estos genes, resultando en la generación de proteínas truncadas en la mayoría de los casos. En algunos casos, estas mutaciones son hereditarias y las mujeres portadoras tienen una probabilidad cinco veces mayor de padecer esta enfermedad. Sin embargo, solo el 5-10% de las mujeres que padecen cáncer de mama son portadoras de mutaciones somáticas en *BRCA1/2*. Aunque las mutaciones en estos genes son la causa más frecuente de cáncer de mama familiar, se consideran raras en tumores esporádicos<sup>45,48</sup>.

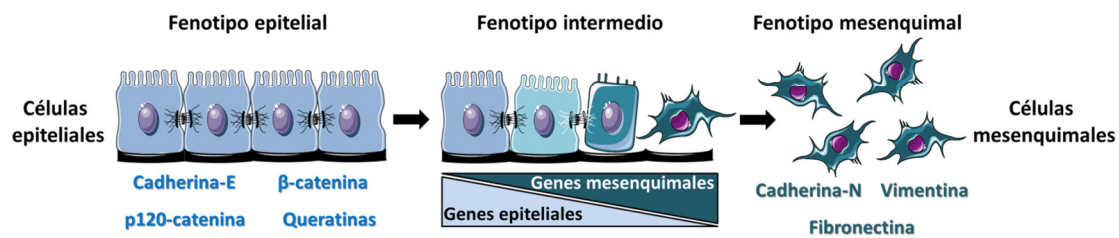
### 2.2.4 Transición epitelio-mesénquima.

El proceso por el cual las células epiteliales se convierten en células mesenquimales se denomina transición epitelio-mesénquima (EMT; del inglés “*Epithelial-to-mesenchymal transition*”), y juega un papel crucial en el desarrollo embrionario y en la diferenciación y reparación de múltiples tejidos, pero también puede causar el desarrollo de fibrosis y promover la progresión del cáncer a través de una variedad de mecanismos. La EMT induce cambios fenotípicos en las células epiteliales, incluyendo la pérdida de adhesión célula-célula,



la pérdida de la polaridad celular y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas (**Figura 5**). Además, induce la aparición de características de célula madre, previene la apoptosis y la senescencia y contribuye a la inmunosupresión. Por lo tanto, el fenotipo mesenquimal de los tumores está asociado con una mayor capacidad migratoria a órganos distantes y su subsecuente diferenciación en múltiples tipos celulares durante el inicio y progresión de la metástasis<sup>49,50</sup>.

Durante este proceso se produce una represión en la expresión de genes epiteliales y se induce la expresión de genes mesenquimales. Estos cambios en los patrones de expresión están mediados por múltiples factores de transcripción, como ZEB1, ZEB2, TWIST1, SNAI1 (Snail) y SNAI2 (Slug), que suprimen la expresión de proteínas de adhesión celular, como la cadherina-E o  $\beta$ -catenina, y potencian la expresión de marcadores mesenquimales, como la cadherina-N, la vimentina o la fibronectina<sup>49,51</sup>. Por lo tanto, la inhibición de este proceso en las células cancerosas puede contribuir a frenar la invasión y la metástasis (**Figura 5**).



**Figura 5. Representación esquemática del proceso de transición epitelio-mesénquima.** Las células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal, perdiendo la adhesión y la polaridad celular y adquiriendo capacidad migratoria e invasiva. Durante este proceso hay una pérdida de expresión de marcadores epiteliales y una ganancia de marcadores mesenquimales. (Basado en Raghu Kalluri; J Clin Invest. 2009<sup>52</sup>).

### 2.2.5 El papel de los microARNs en cáncer de mama.

Los microARNs (miARNs) son pequeñas moléculas de ARN capaces de regular la expresión génica de forma post-transcripcional, que presentan papeles relevantes en múltiples procesos biológicos. La desregulación de los miARNs y las enzimas responsables de su procesamiento (como Dicer, Drosha o proteínas argonautas) está asociada con la iniciación y progresión del cáncer de mama humano. Al igual que los genes codificantes, los miARNs se pueden clasificar en oncogenes y genes supresores tumorales dependiendo del papel que desempeñen en el desarrollo del cáncer. Algunos miARNs, o conjuntos de ellos, llevan a cabo papeles importantes durante los procesos de proliferación, apoptosis, invasión y metástasis y pueden ser usados como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta terapéutica. Además, los perfiles de expresión de miARNs son capaces de clasificar los tumores de mama de acuerdo a sus perfiles



de expresión génica y su estatus de receptores hormonales. En los últimos años, se han propuesto terapias basadas en el bloqueo o sobreexpresión de miARNs, demostrando que ejercen un papel fundamental modulando la respuesta a otros tratamientos, siendo capaces de incrementar su eficacia<sup>53-56</sup>.

### 2.3 Modelos de ratón empleados para el estudio del cáncer de mama.

La clasificación del cáncer de mama en subtipos moleculares ha subrayado la importancia de la adecuada elección del modelo de estudio, sobre todo, en el diseño de estudios preclínicos y clínicos. Los modelos de ratón para el estudio del cáncer de mama pueden clasificarse como: xenoinjertos de líneas celulares, xenotrasplantes derivados de pacientes, modelos singénicos y ratones modificados genéticamente (RMG).

#### 2.3.1 -Xenoinjertos de líneas celulares, xenotrasplantes derivados de pacientes y modelos singénicos.

Los xenoinjertos de líneas celulares humanas de cáncer de mama en ratones inmunodeficientes constituyen un modelo de estudio sencillo y ampliamente utilizado. Este modelo se ha empleado en un gran número de ensayos preclínicos para determinar la respuesta terapéutica de los tumores. La existencia de múltiples líneas celulares que abarcan todos los subtipos moleculares del cáncer de mama y su extensa caracterización, junto con la rápida aparición de los tumores después de la inyección, son las principales ventajas de este modelo. En los modelos de xenoinjertos, la inyección subcutánea en el lomo es una de las vías de administración más ampliamente utilizadas. Sin embargo, el uso de xenoinjertos ortotópicos, es decir, la inyección de las células en su órgano de origen (en este caso, en la almohadilla adiposa de la glándula mamaria o “*fat pad*”) permite evaluar la influencia del estroma mamario en la evolución del tumor, pudiendo complementarse con la inyección de fibroblastos humanos para simular un microambiente específico de especie<sup>57</sup>. Además, la inyección de células tumorales humanas en la vena coccígea o en el seno venoso retro-orbital de los ratones permite estudiar su capacidad para colonizar órganos diana de metástasis. A pesar de ello, los tumores generados a partir de este modelo no reproducen la heterogeneidad intratumoral habitual de los tumores de mama humanos. Los modelos desarrollados a partir de tumores derivados de pacientes (PDX; del inglés “*Patient-derived xenograft*”), en los cuales los tumores de los pacientes son quirúrgicamente implantados en ratones inmunodeficientes, resuelven esta limitación<sup>58</sup>. A pesar de la dificultad que supone el desarrollo de modelos PDX en cáncer de mama respecto a otros tumores, DeRose *et al.* han generado múltiples modelos PDX recapitulando tumores luminales, HER2 y triple negativos<sup>59,60</sup>. Cabe destacar que estos

modelos mantienen la respuesta clínica a muchos tratamientos y, por ello, son ideales para evaluar la idoneidad de algunos tratamientos antes de probarlos en los pacientes.

No obstante, ambos modelos requieren el uso de ratones inmunocomprometidos, impidiendo evaluar la contribución del sistema inmune en el desarrollo tumoral, su progresión y la respuesta al tratamiento. Con el fin de mantener un contexto tumoral con un sistema inmune intacto y un microambiente tumoral específico de especie, se han desarrollado modelos de ratón singénicos, que consisten en el xenoinjerto de líneas celulares tumorales mamarias de ratón, evitando así el uso de animales inmunodeficientes. Los principales inconvenientes de los modelos singénicos son el número limitado de líneas celulares disponibles y la incompatibilidad a la hora de usar terapias específicas para humanos (como anticuerpos monoclonales específicos de especie)<sup>58</sup>.

### 2.3.2 Modelos de ratones modificados genéticamente en cáncer de mama.

Los RMG permiten el estudio de múltiples genes y vías de señalización implicadas en el desarrollo del cáncer. Muchos de estos modelos son capaces de reproducir las principales características fisiopatológicas de los tumores humanos, en un contexto tisular adecuado y con un sistema inmune intacto, incluyendo además el componente estromal y la vascularización. Los RMG han sido ampliamente utilizados para el estudio del cáncer de mama. La sobreexpresión de oncogenes (como *c-Myc*, *ErbB2* o *Ccnd1*), la delección heterocigótica u homocigótica de genes supresores tumorales (como *Trp53*, *Brca1* o *Pten*), así como la generación de mutaciones dirigidas en modelos de ratón, han permitido evaluar y confirmar el papel de muchos genes en el cáncer de mama<sup>61</sup>. Estos modelos son muy relevantes desde un punto de vista clínico, ya que permiten estudiar los eventos iniciales en la formación del tumor, así como su progresión, incluyendo la evolución de hiperplasias a carcinomas *in situ* y, posteriormente, a carcinomas invasivos<sup>58</sup>.

La mayoría de los modelos basados en la ganancia de función de oncogenes emplean promotores cuya expresión esté restringida en gran medida a la glándula mamaria, siendo los más comúnmente utilizados el 5'-LTR (del inglés "*Long terminal repeat*") derivado del virus MMTV, el promotor del gen *WAP* (del inglés "*Whey acidic protein*") y el promotor de la  $\beta$ -lactoglobulina, los cuales muestran una elevada actividad en las células epiteliales lumbinales de la glándula mamaria del ratón<sup>62-64</sup>. Aunque menos frecuentemente utilizados, los promotores de las queratinas K5 y K14 han sido empleados por algunos grupos para dirigir la expresión de transgenes a las células basales de la glándula mamaria, induciendo la aparición de hiperplasias y/o carcinomas mamarios<sup>65-67</sup>.

Por otro lado, la combinación del uso de promotores específicos de tejido, el uso de transgenes cuya expresión sea inducible (por ejemplo, por tetraciclina) y los sistemas de recombinación sitio-específicos de ADN (como el sistema Cre-*LoxP* o el Fip-*Frt*) ha permitido generar ratones con delección o activación de genes de forma condicional y/o inducible. Estos sistemas han permitido controlar el momento y el lugar de expresión del transgén, así como solventar la letalidad de muchos modelos “*Knockout*”<sup>68,69</sup>. La inyección intraductal de vectores virales también ha sido usada para limitar la modificación génica de interés a parte de las células ductales mamarias. Recientemente, se están aplicando también los nuevos sistemas de edición génica (como CRISPR/Cas9) para el estudio del cáncer de mama<sup>70</sup>. El uso combinado de todas estas herramientas ha permitido la generación de gran número de modelos de RMG de gran utilidad en el estudio del cáncer de mama.

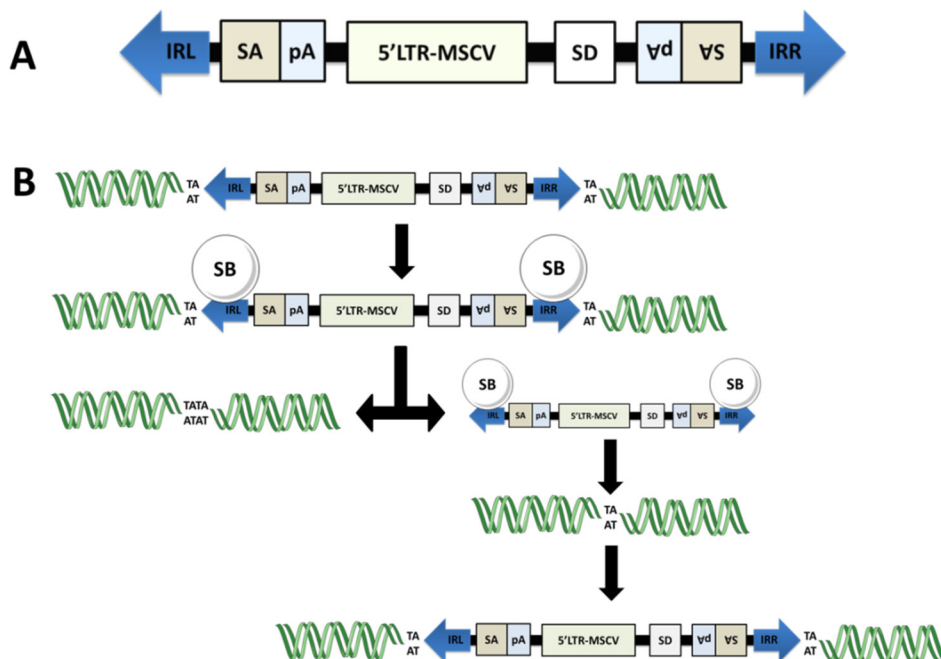
Sin embargo, existen diferencias significativas entre los tumores de mama originados en humanos y en ratones. Los tumores de ratón no se parecen histológicamente a los tumores humanos, y la mayoría metastatizan a los pulmones, mientras que los tumores humanos metastatizan preferentemente en nódulos linfáticos regionales. Además, casi todos los tumores mamarios de ratón son independientes de estímulos hormonales, mientras que el 60-70% de los tumores humanos son dependientes de hormonas<sup>71</sup>. A pesar de esto, varios estudios han analizado las características genómicas de múltiples modelos de ratón, estableciendo su relación con los subtipos de cáncer de mama humano, revelando la heterogeneidad de estos modelos y su utilidad para el estudio de esta patología<sup>72,73</sup>.

### 3. El sistema de transposición “*sleeping beauty*”.

La mutagénesis insercional es una herramienta de utilidad para la identificación de nuevos oncogenes o genes supresores de tumores en modelos de ratón. Algunos retrovirus (como el virus de la leucemia de ratón (MuLV) o el virus del tumor mamario del ratón (MMTV)) han sido ampliamente utilizados para generar mutagénesis insercional en ratones<sup>74</sup>. Sin embargo, el uso de retrovirus como método de mutagénesis insercional presenta varias limitaciones: su tropismo por tejidos específicos, su baja eficiencia de infección en células de replicación lenta, así como su preferencia para integrarse cerca de regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos<sup>75,76</sup>.

La mutagénesis insercional mediada por transposones proporciona una herramienta capaz de solventar estos problemas. Los transposones son fragmentos de ADN con la capacidad de cambiar su posición dentro del genoma; este proceso está mediado por una enzima

(transposasa) normalmente codificada por el transposón. La familia de transposones “*sleeping beauty*” (denominada así por haber sido rescatada, mediante mutación dirigida, a partir de copias de transposones que a lo largo de la evolución habían perdido la capacidad de movilización por acumulación de mutaciones) ha sido ampliamente utilizada para identificar genes relacionados con el desarrollo del cáncer en diversos modelos de ratones transgénicos<sup>77</sup>. La transposición puede ocurrir a cualquier parte del genoma con el dinucleótido TA, siendo éste duplicado en el sitio de inserción<sup>78</sup>. Los transposones de esta familia usados para la determinación de genes importantes en cáncer (como por ejemplo T2/Onc2) no codifican la transposasa, sino que en su lugar contienen sitios aceptores de “*splicing*” (SA) y secuencias de poliadenilación (pA) en ambas orientaciones (para interrumpir la expresión génica o producir proteínas truncadas en caso de que se integre dentro de un gen) y secuencias promotoras seguidas de un sitio donador de “*splicing*” (SD) (para inducir la sobreexpresión de genes cercanos) (Figura 6). De esta manera, si el transposon se integra en genes implicados en cáncer (oncogenes o genes supresores de tumores), puede ayudar al desarrollo tumoral. Además, al ser conocida la secuencia del transposón, puede determinarse su lugar de integración en el genoma, así como los genes afectados y su orientación respecto a ellos.



**Figura 6. El sistema de transposición “sleeping beauty”.** A) Estructura del transposón mutagénico T2/Onc2. El transposón está flanqueado por repeticiones invertidas a izquierda y derecha (IRL e IRR respectivamente; del inglés “*inverted repeat left and right*”) y contiene sitios aceptores (SA) y secuencias de poliadenilación (pA) en ambas orientaciones, y un promotor (5'-LTR-MSCV) seguido de un sitio donador (SD). B) La transposasa (indicada como SB), codificada en otro vector, se une a los sitios IRL e IRR y escinde el transposón de su lugar de origen, insertándolo en cualquier lugar del genoma con un dinucleótido TA, siendo éste duplicado en el proceso de inserción.

El uso del sistema de transposición “*sleeping beauty*” como herramienta para la determinación de genes importantes en cáncer pasa por la generación de animales transgénicos portadores de numerosas copias del transposón en su genoma. Cuando estas copias se movilizan (típicamente como consecuencia de la expresión de la transposasa SB, a partir de otro transgén), pueden facilitar la aparición de tumores. Al analizar los lugares de integración de las copias del transposón en numerosos tumores, se pueden usar herramientas estadísticas para determinar los denominados sitios comunes de inserción (CIS; del inglés “*Common insertion sites*”). Los CIS son regiones genómicas que presentan integraciones en múltiples tumores y en un número superior al esperado debido al azar, probablemente por la ventaja selectiva que adquieren las células tumorales con dicha integración<sup>79</sup>.

### 3.1 Aplicación del sistema de transposición “*sleeping beauty*” en el cáncer de mama.

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, se desarrolló un modelo para el estudio de nuevos genes implicados en el cáncer de piel. Para ello, se emplearon ratones transgénicos con un concatémero de 200-350 copias del transposón mutagénico T2/Onc2 y que expresaban la transposasa SB11 bajo el control de los elementos reguladores de la queratina K5 (ratones SB/T2). Estos animales mostraban movilización de los transposones en los lugares de expresión de la queratina K5 (capas basales de la piel y epitelios estratificados y células mioepiteliales de glándulas exocrinas). Para facilitar la aparición de tumores, se realizaron procedimientos de carcinogénesis química cutánea y la combinación del genotipo SB/T2 con ratones Tg.AC (portadores de un transgén v-Ha-Ras activo en piel) y ratones p53+/- . Curiosamente, mientras los dos primeros modelos desarrollaron preferentemente tumores de origen cutáneo<sup>80</sup>, los ratones SB/T2/p53+/- presentaron una alta incidencia de tumores mamarios.

Se obtuvieron 37 tumores de mama a partir de 30 hembras, de los cuales 5 se desarrollaron en ratonas SB/T2 y 32 en ratonas SB/T2/p53+/- . La identificación de los sitios de integración del transposón en estos tumores se llevó a cabo mediante el sistema de secuenciación de Illumina. Posteriormente, se realizó el análisis de los CIS englobando ambos grupos de tumores y de los genes afectados por esos sitios de integración (**Tabla 2**):

Símbolo del gen	p-valor	Número de tumores	Efecto mutagénico predicho	Símbolo del gen	p-valor	Número de tumores	Efecto mutagénico predicho
<i>Rasa1</i>	0	11	Pérdida de función	<i>Ankrd11</i>	6,06E-31	4	Pérdida de función
<i>4930412013Rik</i>	0	3	Pérdida de función	<i>Zfr</i>	1,17E-27	3	Pérdida de función
<i>Eras</i>	0	3	Ganancia de función	<i>Map4k5</i>	3,03E-24	3	Pérdida de función
<i>Nfib</i>	0	14	Pérdida de función	<i>Tead1</i>	1,30E-23	4	Pérdida de función
<i>Nf1</i>	0	15	Pérdida de función	<i>Flnb</i>	1,00E-21	3	Pérdida de función
<i>Gata3</i>	0	4	Pérdida de función	<i>Ankrd28</i>	4,88E-15	3	Pérdida de función
<i>Ube2f</i>	0	5	Pérdida de función	<i>Dmxl1</i>	1,01E-13	3	Ganancia de función
<i>Ripk4</i>	0	3	Pérdida de función	<i>Fbxw7</i>	4,04E-13	3	Pérdida de función
<i>Pten</i>	1,47E-77	5	Pérdida de función	<i>Trps1</i>	1,21E-08	3	Pérdida de función
<i>Smad3</i>	1,59E-32	3	Pérdida de función	<i>Fam135b</i>	1,46E-08	3	Ganancia de función
<i>Ccnd3</i>	2,59E-32	3	Ganancia de función				

**Tabla 2. Lista de los 21 CIS en los tumores de mama generados por los ratones SB/T2/p53+/- y SB/T2.** Los genes están ordenados según su relevancia estadística.

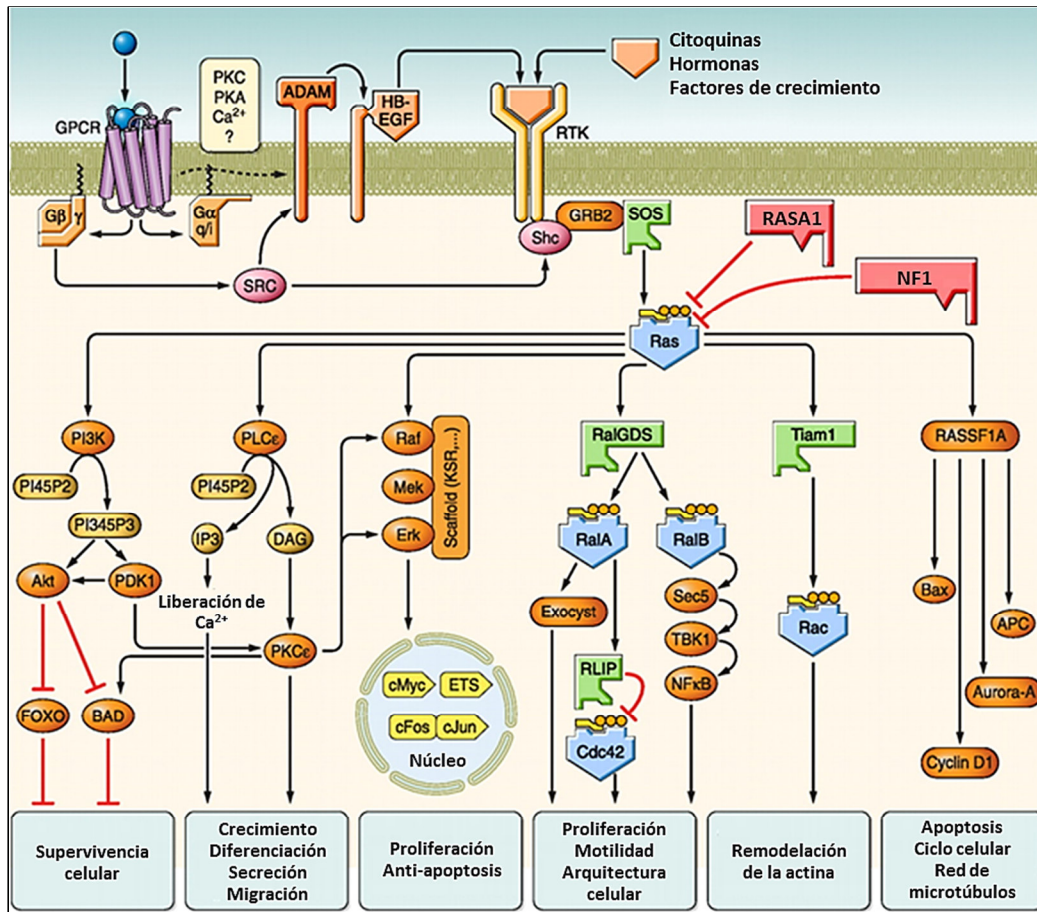
La mayoría de estos genes han sido relacionados con el desarrollo y/o progresión del cáncer en algún tejido y el 33% (7 de 21) tienen un gen humano homólogo (*CCND3*, *FBXW7*, *GATA3*, *NF1*, *NFIB*, *PTEN* y *SMAD3*) cuyas mutaciones han sido causalmente implicadas en cáncer según el *Cancer Gene Census* (v78; 05/09/2016). Además, *PTEN* y *GATA3* son genes muy frecuentemente mutados en cáncer de mama<sup>42,45,81</sup>. Por otra parte, la translocación de *NFIB* y la disminución en los niveles de expresión de *SMAD3* y *FBXW7* también han sido asociadas con esta patología<sup>82-84</sup>. Un análisis de ontología génica (GO; del inglés “*Gene Ontology*”) mostró una predilección de inserción en genes involucrados en la adhesión de la matriz celular, la apoptosis, la proliferación y el ciclo celular.

Curiosamente, 3 de los genes que encabezan la lista (*Rasa1*, *Nf1* y *Eras*) participan en la vía de señalización de Ras. *Rasa1* y *Nf1* son reguladores negativos de Ras, mientras que *Eras* es un miembro de la familia Ras. Aunque las mutaciones en el gen humano *NF1* han sido asociadas con el desarrollo del cáncer de mama durante la realización de este trabajo de tesis, el papel de *RASA1* en esta enfermedad no ha sido claramente establecido. Por otro lado, la posible implicación de *ERAS* en el cáncer de mama no ha sido estudiada hasta el momento. Por estas razones, decidimos estudiar el papel de *RASA1* y *ERAS* en el cáncer mamario.

#### 4. La vía de señalización de Ras y su implicación en cáncer.

Las pequeñas GTPasas de la familia Ras son un grupo de 35 proteínas que exhiben una marcada conservación en su estructura y que actúan como interruptores moleculares dentro de la célula, ciclando entre una forma activa unida a una molécula de guanósín trifosfato (GTP) y una forma inactiva unida a una molécula de guanósín difosfato (GDP). Estas moléculas median la transducción de señales entre receptores de superficie de la célula y efectores intracelulares, jugando un papel clave en varios procesos celulares que incluyen la progresión del ciclo celular, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación (**Figura 7**).





**Figura 7. Principales vías de señalización mediadas por Ras.** Ras activo (unido a un GTP) señala a través de múltiples efectores promoviendo la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular, además de regular mecanismos implicados en la apoptosis y en la arquitectura de la célula. Las proteínas NF1 y RASA1 actúan como Ras-GAPs, catalizando la hidrólisis del GTP a GDP e inactivando a Ras. (Modificado desde Erzsébet Ligeti; *Physiol Rev.* 2012 <sup>85</sup>).

La activación de las proteínas Ras (es decir, el intercambio de un GDP por un GTP) es catalizada por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs; del inglés “*Guanine nucleotide exchange factors*”), mientras que su inactivación (la hidrólisis de un grupo fosfato del GTP dando lugar a un GDP) es catalizada por las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs; del inglés “*GTPases-activating proteins*”). Los miembros de la familia Ras que han sido estudiados en mayor profundidad son *H-RAS*, *N-RAS* y *K-RAS*, los cuales comparten algunas funciones solapantes como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Sin embargo, los diferentes miembros de esta familia exhiben patrones de expresión particulares, pueden modular su señal a través de distintos efectores y presentan dominios específicos o diferentes localizaciones dentro de la célula. Las mutaciones en genes miembros de la familia Ras o en alguno de sus genes reguladores están comúnmente asociadas con trastornos del desarrollo y la progresión del cáncer. *H-RAS*, *N-RAS* y *K-RAS* son algunos de los genes mutados con mayor frecuencia en cáncer (principalmente en los codones G12, G13 y Q61). Estas mutaciones

confieren resistencia a la acción de las GAPs y originan, por lo tanto, proteínas constitutivamente activas de carácter oncogénico<sup>86</sup>.

Según el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC v78), que representa la base de datos de mutaciones en cáncer humano más completa actualmente disponible, alrededor del 10% de los tumores analizados presentan mutaciones activadoras en algunos de los 3 miembros principales de la familia Ras. El cáncer de páncreas tiene la incidencia más elevada, con un 56% de tumores con mutaciones en *K-RAS*. Sin embargo, menos del 1% de más de 10.000 tumores de mama analizados en COSMIC presentan mutaciones en Ras.

La pérdida de función de genes Ras-GAP también puede contribuir a la activación permanente de Ras, favoreciendo el desarrollo tumoral. En los últimos años se ha resaltado la importancia de los genes Ras-GAP como genes supresores tumorales y su inactivación representa un mecanismo importante y alternativo para la activación de Ras y sus efectores en el cáncer humano. La proteína con función Ras-GAP más extensamente estudiada es la neurofibromina 1, codificada por el gen *NF1*, el cual es considerado como un supresor tumoral y está localizado en el cromosoma 17. Las mutaciones germinales en *NF1* están asociadas al desarrollo de la neurofibromatosis de tipo I, cuya característica clínica distintiva es el desarrollo de tumores benignos del sistema nervioso periférico conocidos como neurofibromas. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los pacientes con neurofibromatosis de tipo I desarrollarán un tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos, estando predispuestos a desarrollar una variedad de otros tumores, incluyendo gliomas, feocromocitomas, melanomas, leucemias mieloides o tumores mamarios<sup>87-89</sup>. No obstante, el papel de *NF1* en el desarrollo de tumores esporádicos no había sido descrito hasta hace poco. Algunos estudios genómicos sugieren que *NF1* está mutado y/o inactivo en una amplia gama de tumores esporádicos, tales como glioblastomas, adenocarcinomas de pulmón, cáncer de mama, leucemias, cáncer de ovario y neuroblastomas<sup>47,90-94</sup>.

El gen *RASA1* (también denominado *P120RASGAP*) está localizado en el cromosoma 5 y codifica una proteína cuya función más conocida es la de regulador negativo de Ras, presentando un dominio Ras-GAP en su región C-terminal. Además, esta proteína presenta dos dominios SH2 ("*Src homology 2*") y un dominio SH3 ("*Src homology 3*") en la región N-terminal; y unos dominios PH ("*pleckstrin homology*") y C2 ("*protein kinase C conserved region 2*") en la región central. Por lo tanto, *RASA1* tiene otros papeles además de la regulación de Ras, entre los que se incluyen la unión al receptor del factor de crecimiento epidérmico fosforilado, al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y a receptores de insulina. Además,



RASA1 también interacciona con p190-RhoGAP o DLC1, modulando así la vía de señalización de RhoA<sup>95-97</sup>. Por otro lado, los ratones “knockout” para *Rasa1* muestran una letalidad embrionaria temprana asociada con defectos en la angiogénesis y un incremento en la apoptosis neuronal<sup>98</sup>. En humanos, las mutaciones en *RASA1* han sido asociadas con malformaciones arteriovenosas y capilares<sup>99,100</sup> y con el desarrollo de carcinomas basales<sup>101</sup>. Recientemente, se ha asociado la reducción en los niveles de expresión de *RASA1* con el cáncer colorrectal y, además, las alteraciones en el locus de *RASA1* son un evento frecuente en el cáncer de próstata más agresivo<sup>102,103</sup>.

El papel de otros miembros de la familia Ras, como *R-RAS*, *TC21*, *M-RAS*, *RASD1* o *ERAS*, aún no ha sido ampliamente descrito. El gen *ERAS* (*Embryonic stem* (ES) *cell-expressed Ras*), localizado en el cromosoma X, fue identificado en 2003 como un nuevo miembro de la familia Ras en células madre embrionarias de ratón indiferenciadas<sup>104</sup>. *ERAS* ha sido considerado como un pseudogén durante mucho tiempo y, por ello, no fue incluido hasta recientemente en los análisis masivos de expresión génica. Por lo tanto, la expresión de este gen ha sido pobremente estudiada, siendo desconocido aún en gran parte su papel en el desarrollo y la tumorigénesis. Cabe destacar que, a diferencia de todos los demás miembros de la familia Ras, *ERAS* es una proteína constitutivamente activa y, por lo tanto, es insensible a las proteínas Ras-GAP. Esto se debe a que *ERAS* contiene una serina en lugar de una glicina en el residuo 50 (análogo al residuo 12 en H-, N- y K-RAS dentro del dominio de unión a nucleótidos de guanina). Además, *ERAS* presenta diferencias significativas en las regiones de unión a moléculas efectoras, sugiriendo que esta proteína puede utilizar efectores distintos que otros miembros de la familia Ras y, por ende, desempeñar funciones celulares diferentes. Sin embargo, aunque aún no se han identificado completamente las moléculas efectoras de *ERAS*, se sabe que se une y activa la vía de PI3K. Asimismo, *ERAS* posee un extremo N-terminal único que lo distingue de los miembros clásicos de la familia y que es importante en su actividad de señalización<sup>105</sup>. *ERAS* desempeña un papel importante durante el desarrollo embrionario temprano en ratones, pero su expresión es indetectable en células madre diferenciadas y en tejidos adultos<sup>104,106</sup>. Recientemente se ha descrito la expresión de *ERAS* en carcinomas gástricos humanos promoviendo la progresión e invasión de los tumores<sup>107,108</sup>.

## ***Objetivos -***

---



## Objetivos -

---

El objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar el papel en el cáncer de mama humano de algunos genes previamente identificados en nuestro laboratorio como posibles causantes de tumores mamarios usando un modelo de ratón generado mediante el sistema de transposición “*sleeping beauty*”. En concreto, se seleccionaron dos genes cuya alteración resulta en la activación de la vía de señalización de Ras, *RASA1* y *ERAS*, para los que se desconocía su posible implicación en esta patología antes de realizar el presente trabajo de investigación. Así pues, se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudio *in vitro* e *in vivo* del papel de los genes *RASA1* y *ERAS* en el desarrollo del cáncer de mama, su implicación en los mecanismos de invasión y metástasis, así como el estudio de las vías moleculares involucradas en estos procesos.
- Validación de la relevancia clínica de las alteraciones en los genes *RASA1* y *ERAS* en tumores de mama humanos; estudio de la posible relación entre la alteración de estos genes y la aparición de alguno de los subtipos moleculares concretos de esta enfermedad.
- Generación y caracterización de un modelo de ratones transgénicos con expresión alterada de *ERAS* en la glándula mamaria para el estudio de su papel en la tumorigénesis mamaria.



## ***Materiales y métodos -***

---



## Materiales y métodos -

---

### 1. Recolección de las muestras.

#### 1.1 Muestras humanas.

Las muestras de pacientes utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Biobanco i+12 del Hospital 12 de Octubre, integrado en la Red Temática de Investigación Cooperativa de Biobancos Hospitalarios (RETBIOH; [www.redbiobancos.es](http://www.redbiobancos.es)), siguiendo los procedimientos de operación estándar, con el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación de los Comités Éticos y Científicos. Las muestras de tumores de mama humanos fueron suministradas como cortes de parafina sobre portaobjetos y en tubos eppendorf. Además, se obtuvo información sobre el subtipo tumoral, así como una lista de diversos parámetros clínicos (Anexo I).

#### 1.2 Muestras de ratón.

Tras la eutanasia de los animales se procedió a la toma de muestras:

##### 1.2.1 Para el análisis histológico.

Las muestras se fijaron en formaldehído tamponado (pH 7) al 3,7-4% o en etanol al 70%. Tras 24 horas, las muestras fijadas en formaldehído se lavaron con agua, se pasaron a etanol al 50% durante dos horas y se conservaron en etanol al 70% hasta el momento de la inclusión en parafina.

##### 1.2.2 Para la extracción de ARN.

Las muestras se conservaron en una solución para la estabilización del ARN (*RNAlater*; Thermo Fisher Scientific) durante toda la noche a 4°C y posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento de la extracción.

##### 1.2.3 Para la extracción de proteína.

Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de la extracción.



## **2. Líneas celulares y medios de cultivo.**

Las células MCF10A se adquirieron de la “*American Type Culture Collection*” (ATCC). Los cultivos en monocapa y tridimensionales de células MCF10A se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Debnath *et al.*, 2003<sup>109</sup>. El medio de las células MCF10A está compuesto por DMEM/F12 (Gibco) suplementado con un 5% de suero de caballo (Gibco), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF; Peprotech), 10 µg/ml de insulina (Sigma), 0,5 µg/ml de hidrocortisona (Sigma), 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma) y penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-shRasa1 y MCF10A-ERAS se cultivaron en placas tratadas previamente con gelatina al 0,1% debido a su limitada adhesión a las placas. Durante los experimentos, el resto de las líneas MCF10A también se cultivaron en placas revestidas con gelatina para homogeneizar condiciones.

Para el cultivo tridimensional de las células MCF10A se emplearon portaobjetos con cuatro cámaras para cultivo celular (BD Falcon *Culture Slide*). Tras tripsinizar las células, se resuspendieron en un medio similar al medio de crecimiento de las células MCF10A pero con un 2% de suero de caballo, 5 ng/ml de EGF y un 2% de matrigel (“*Growth Factor Reduced Matrigel*”, BD Biosciences). En el fondo de las cámaras se añadió una capa de matrigel y, tras su solidificación, se sembraron unas 5.000 células de cada tipo celular en cada cámara y por duplicado. Este medio se renovó cada cuatro días.

Las células MDA-MB-231 fueron proporcionadas por la Dra. MJ Caloca (Instituto de Biología y Genética Molecular, CSIC) y se cultivaron en medio DMEM (“*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*”) con Glutamax y niveles elevados de glucosa (4,5 g/l) (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (HyClone; GE Healthcare Life Sciences), aminoácidos no esenciales (Gibco) y antibiótico/antimicótico (Gibco).

Las células 293T se adquirieron de la ATCC y se cultivaron en medio DMEM con Glutamax y niveles elevados de glucosa (4,5 g/l) (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (HyClone; GE Healthcare Life Sciences) y antibiótico/antimicótico (Gibco).

Todas las células se cultivaron en placas de plástico estándar para el cultivo de tejidos (Corning) y en incubadoras humidificadas, con un 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Así mismo, todas las células se lavaron con PBS (Sigma) y se separaron de las placas de cultivo mediante una solución de tripsina/EDTA (Sigma).

### 3. Plásmidos y vectores retrovirales.

#### 3.1 Construcción y adquisición de plásmidos.

Para la construcción de los plásmidos portadores de las horquillas pequeñas de ARN (shARNs, “*Small Hairpin RNA*”) empleamos dos secuencias específicas para el gen *RASA1* cuya eficiencia inhibitoria ha sido estudiada y descrita previamente<sup>110,111</sup> (**Figura 8**). La secuencia correspondiente al sh1 va dirigida contra el exón 18 de *RASA1*, mientras que la secuencia del sh2 va dirigida contra el 3'-UTR. El vector pLVTHM-cherry con la secuencia shARN inespecífica (descrita previamente por Ambion, vector pSilencer 3.1-H1 puro; **Figura 8**) fue proporcionado por la Dra. Paula Río (División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético, CIEMAT). Las secuencias de los shARNs se clonaron en el vector pLVTHM-cherry en los sitios de restricción MluI y ClaI, dirigiendo su expresión por el promotor H1 (promotor dependiente de la ARN polimerasa III). Todas las enzimas empleadas para realizar los clonajes fueron de New England BioLabs y se utilizaron con sus correspondientes tampones.

##### shARN 1:

###### MluI

5'-CGCGTAAAGATGAAGCCACTACCCTATTTCTCGAGAAATAGGGTAGTGGCTTCATCTTTTTTGGAAAT-3'  
3'-ATTCTACTTCGGTGATGGGATAAAGAGCTCTTTTATCCCATCACCAGTAGAAAAAACCTTTAGC-5'

Clal

##### shARN 2:

###### MluI

5'-CGCGTGCTGCCTAACTTATCCATCTTCTCGAGAAAGATGGATAAGTTAGGCAGCTTTTTGGAAAT-3'  
3'-ACGACGGATTGAATAGGTAGAAAGAGCTCTTTCTACCTATTCAATCCGTCGAAAAACCTTTAGC-5'

Clal

##### shARN inespecífico:

###### MluI

5'-CGCGTCCCCACTACCGTTGTATAGGTGTTCAAGAGACACCTATAACAACGGTAGTTTTTGGAAAT-3'  
3'-AGGGGTGATGGCAACATATCCACAGTTCTCTGTGGATATTGTTGCCATCAAAAACCTTTAGC-5'

Clal

**Figura 8. Secuencias de los shARNs específicos de RASA1.** Se representan las cadenas sentido y antisentido de cada shARN. En azul se indican los nucleótidos correspondientes a los sitios de corte de las enzimas de restricción MluI y ClaI para su posterior clonaje en el vector pLVTHM-cherry. En verde se indican los nucleótidos correspondientes a la región de la horquilla (el sitio de restricción XhoI se muestra subrayado).

Para realizar el clonaje de los shARNs, se hibridaron los oligonucleótidos complementarios mediante su calentamiento a 100°C y posterior enfriamiento gradual en un tampón NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y ditiotretitol (DTT) 1 mM (NEBuffer 2). Los extremos 5' de los oligonucleótidos se fosforilaron utilizando la enzima T4 PNK (polinucleótido quinasa) y el tampón de la enzima T4 ADN ligasa. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C y luego a 70°C durante 10 minutos para inactivar la PNK. El plásmido pLVTHM-cherry se

digirió con las enzimas MluI y ClaI, se defosforilaron los extremos generados utilizando la enzima CIP (“*Calf intestinal phosphatase*”) y se realizó la ligación del vector con los diferentes shARNs empleando la enzima T4 ADN ligasa.

A continuación, se transformaron bacterias competentes XL-Blue con la mezcla de ligación; estas bacterias crecieron durante toda la noche a 37°C en medio agar-LB (Luria-Bertani, Pronadisa) con ampicilina (100 ng/μl). Se extrajo el ADN de alguna de las colonias resultantes, y se comprobaron las minipreps por digestión con la enzima XhoI (incluida en la horquilla de los shARNs de *RASA1*) y posteriormente mediante secuenciación para confirmar la presencia e integridad de los shARNs y la ausencia de secuencias en tándem.

Los vectores lentivirales de tercera generación que codifican los microARNs miR-200c y miR-141<sup>112</sup> (pMIR200c-copGFP y pMIR141-copGFP) y el vector retroviral pWZL-TP53(R175h)-IRES/Hygro fueron proporcionados por el Dr. Sergio Ruiz (Grupo de inestabilidad genómica, CNIO). Los microARNs se expresan bajo el promotor CMV7 (“*Cytomegalovirus*”) y la proteína p53 mutante se expresa bajo el promotor MuMoLV (“*Murine Moloney Leukemia Virus*”). El vector vacío control (miR-V) se generó mediante la digestión del plásmido pMIR-200c-copGFP con BamHI, extrayendo así la región precursora de miR-200c, y su posterior religado con la enzima T4 ADN ligasa.

Para generar el plásmido pRc/CAG-HA-hERAS, amplificamos el gen *ERAS* a partir de ADN genómico humano extraído de saliva mediante el uso de un sistema de PCR para regiones ricas en nucleótidos GC (Roche) y los siguientes cebadores:

- Un cebador directo que incluye el epítipo HA y el sitio de restricción HindIII:

5'-ACAAGCTTAATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGAGCTGCCAACAAAGCCTGGC-3'

- Un cebador inverso que incluye el sitio de restricción NotI:

5'-CTCGCCGGCGTTCAGGCCACAGAGCAGCCACAGTG-3'

El producto de PCR se insertó en un vector de clonaje TA (*pGEM-T Easy*, Promega) y la secuencia se comprobó mediante secuenciación, dando lugar al vector pGEM-HA-hERAS. Este vector fue digerido con HindIII y NotI y se obtuvo la banda correspondiente al inserto tras su purificación mediante un gel de agarosa al 1% en TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA; Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM; pH 8) y el uso de columnas de sílice (*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, Macherey-Nagel). Este inserto se ligó con el vector pRc-CAG mediante la enzima T4 ADN ligasa, el cual había sido previamente digerido con HindIII y NotI, defosforilado con la

enzima CIP y purificado con el mismo procedimiento que el inserto. En este vector, *ERAS* se expresa bajo el control del promotor CAG (un promotor sintético derivado de la beta-actina, utilizado con frecuencia para inducir la expresión de genes en mamíferos<sup>113</sup>). Además, este vector confiere resistencia a la neomicina.

Para generar el vector transgénico BK5-HA-hERAS, se digirió un plásmido conteniendo 5.2 kbp de secuencias 5' de la queratina bovina K5, el intrón 2 de la b-globina y señales de poliadenilación (vector derivado de K5 para la expresión de transgenes en animales desarrollado en nuestro laboratorio) con la enzima *SnaBI* y se desfosforiló con la enzima CIP. El inserto HA-hERAS se extrajo del vector pGEM-HA-hERAS mediante la digestión con *EcoRI* y los extremos cohesivos se hicieron romos con la enzima T4 ADN polimerasa. Tanto el vector como el inserto se purificaron como se describe previamente en este apartado y se ligaron mediante la enzima T4 ADN ligasa.

### 3.2 Transfección de líneas celulares.

Los plásmidos pRc-CAG-HA-hERAS y pRc-CAG control se transfectaron en las células MCF10A y MDA-MB-231 mediante electroporación usando el kit “*SE Cell Line 4D-Nucleofector*” (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, se emplearon los programas DS-138 y CH-125, respectivamente, del 4D-nucleofector (Lonza). 48 horas después de la nucleofección, se añadió el antibiótico G418 (Geneticina) al medio de cultivo (300 µg/ml para las células MCF10A y 1 mg/ml para las MDA-MB-231; Calbiochem) para seleccionar las células que integraron el plásmido. En todos los casos, se agruparon más de 100 clones diferentes de células resistentes para la creación de estas nuevas líneas celulares.

### 3.3 Generación de vectores retrovirales.

Para la generación de los vectores retrovirales se emplearon las células empaquetadoras 293T. Los plásmidos pLVTHM, pMIR y pWZL se co-transfectaron en las células 293T con sus correspondientes plásmidos empaquetadores mediante el empleo de polietilenimina (a una concentración final de 130 nM; Polysciences). Para los lentivirus de segunda generación portadores de los shARNs, se emplearon los plásmidos empaquetadores pMDLg/pRRE y pMD2.G. Para los lentivirus de tercera generación portadores de los microARNs, se emplearon los plásmidos empaquetadores pMDLg/pRRE, pRSV-REV y pMD2.G. Por último, para el retrovirus portador de la forma mutante de p53, se emplearon los plásmidos empaquetadores pNGVL3-4070 y pNGVL3-MLV-gag-pol. En el caso de los vectores lentivirales, el sobrenadante de las 48 y 72 horas post-transfección fue recogido, filtrado con un filtro de 0,45 µm,

ultracentrifugado para concentrar el virus (68.000 g, durante 2 horas a 4°C) y posteriormente resuspendido en PBS (Sigma). En el caso del retrovirus pWZL-p53(R175H), el sobrenadante se filtró (0,45 µm) y se añadió a las placas de cultivos sin centrifugar.

Las células infectadas con los lentivirus pLVTHM-cherry y pMIR-copGFP fueron seleccionadas por citometría de flujo (BD Influx), estableciéndose líneas celulares a partir de miles de células independientes infectadas por el virus. Las células infectadas por el retrovirus pWZL-p53(R175H) se seleccionaron mediante la adición de higromicina B al medio de cultivo (100 µg/ml; Invitrogen), generándose líneas a partir de más de 50 clones diferentes.

#### **4. Análisis histológico.**

Tras la fijación, las muestras de tejido se procesaron de forma estándar: se incluyeron en parafina y posteriormente se confeccionó un bloque. Para valorar la morfología del tejido, se realizaron cortes de 3-5 µm de los bloques de parafina con un microtomo y se llevó a cabo una tinción de hematoxilina-eosina mediante técnicas estándar.

#### **5. Análisis inmunohistoquímico.**

Los portaobjetos con las muestras fueron desparafinados y rehidratados siguiendo protocolos estándar. Para las muestras de ratón, el desenmascaramiento del antígeno se llevó a cabo mediante el empleo de un tampón de citrato sódico (ácido cítrico monohidratado 1,8 mM y citrato trisódico dihidratado 8,2 mM; pH 6) usando un horno microondas (3 minutos a 900 W y, posteriormente, 15 minutos a 150 W) para todo los anticuerpos, excepto para ERAS, para el cual se empleó un tampón de Tris-EDTA (Target Retrieval Solution pH 9; Dako) y una olla a presión (Dako, Agilent Technologies). Para las muestras humanas, el desenmascaramiento del antígeno se realizó con la olla a presión para todos los anticuerpos, empleando el tampón de Tris-EDTA para RASA1, NF1 y ERAS, y el tampón de citrato sódico para p53 y p-ERK. La peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno al 0.3% disuelto en metanol durante 15 minutos. Los epítomos inespecíficos se bloquearon con suero de caballo al 10% disuelto en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM; pH 7,2) durante 30 minutos a 37°C. Los anticuerpos primarios (página 47; **Tabla 3A**) se incubaron durante toda la noche a 4°C diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios (página 48; **Tabla 3B**), conjugados con biotina, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente diluidos en la solución de bloqueo. Para amplificar la señal, se empleó un sistema de biotina-avidina-peroxidasa (VECTASTAIN elite ABC HRP kit, Vector Laboratories), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. La señal se visualizó usando

diaminobencidina como sustrato de la peroxidasa (DAB Kit, Vector Laboratories). Todos los lavados se llevaron a cabo con PBS (3 lavados de 10 minutos entre cada paso). Finalmente, las muestras se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron empleando procedimientos estándar y se montaron usando un adhesivo de montaje (CV Mount, Leica Biosystems). Las imágenes se tomaron con un microscopio óptico (Olympus BX41) y una cámara digital (Olympus DP21).

### 5.1 Valoración de las tinciones inmunohistoquímicas.

Las tinciones inmunohistoquímicas de los tumores de los ratones con transposición se valoraron de la siguiente manera: la tinción de las queratinas K8 y K5 y de la transposasa SB11 se valoró usando una escala arbitraria de 0 a 3 (correspondiendo el valor 0 a una tinción negativa y el valor 3 a una tinción generalizada). La tinción del receptor de estrógenos se consideró positiva cuando más del 1% de las células tumorales fueron positivas. Además también se valoró de 0 a 3.

En los tumores mamarios humanos, la intensidad de las tinciones de RASA1 y NF1 en las regiones tumorales fue comparada con la intensidad en el tejido mamario normal en cada muestra, y fue cuantificada a ciegas mediante el uso de una escala arbitraria. La tinción de RASA1 se cuantificó de 0 a 3 (correspondiendo el valor 0 a una tinción negativa y el valor 3 a una tinción intensa). Dado que todos los tumores presentaban tinción positiva de NF1, esta tinción se cuantificó de 1 a 4 (correspondiendo el valor 1 a una tinción leve y el valor 4 a una tinción muy intensa). Además, dada la heterogeneidad de la tinción de NF1 en los tumores, se valoraron 5 campos independientes dentro de cada tumor y se halló la media de intensidad intratumoral. Tanto para la tinción de p53 como para la de p-ERK, se consideraron positivos aquellos tumores en los que la mayor parte de las células (>80%) mostraban una tinción positiva.

Tanto en las tinciones de las muestras de ratón como en las humanas (así como en la relación de éstas con sus parámetros clínicos), los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante análisis de contingencia, empleando para ello el test exacto de Fisher o el test de la Chi-cuadrado, según proceda.

## **6. Análisis mediante inmunofluorescencia.**

### **6.1 Inmunofluorescencias de cultivos celulares y de muestras de tejido.**

Para llevar a cabo las inmunofluorescencias de cultivos celulares, las células se sembraron sobre cubreobjetos tratados previamente con gelatina al 0,1% en PBS. Tras alcanzar la confluencia adecuada, se fijaron con paraformaldehído tamponado al 4% (15 minutos a 4°C) y se permeabilizaron con una disolución de PBS con 0,1% de Triton X-100 (10 minutos a temperatura ambiente). Para las inmunofluorescencias de tejidos, los portaobjetos con las muestras fueron desparafinados y rehidratados siguiendo protocolos estándar, y el desenmascaramiento del antígeno se llevó a cabo mediante el empleo de un tampón de citrato sódico usando un horno microondas (3 minutos a 900 W y, posteriormente, 15 minutos a 150 W). En ambos casos, los epítomos inespecíficos se bloquearon con suero de caballo al 10% disuelto en PBS durante 30 minutos a 37°C. Los anticuerpos primarios (página 47; **Tabla 3A**) se incubaron durante toda la noche a 4°C diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios (página 48; **Tabla 3B**), conjugados con fluorocromos, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente diluidos en la solución de bloqueo. Todos los lavados se llevaron a cabo con PBS (3 lavados de 10 minutos entre cada paso). Tanto los cubreobjetos con las células como los portaobjetos con los tejidos se montaron empleando un medio de montaje acuoso (Mowiol; Fluka) con 1 µg/ml de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol; Roche) para teñir los núcleos. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan2 y una cámara digital AxioCam MRm (Zeiss).

Se llevaron a cabo inmunofluorescencias de co-cultivos celulares con las células MCF10A control y MCF10A-ERAS (ya que el epítomo HA permite diferenciar aquellas células que expresan ERAS) pudiendo así compararse los niveles de expresión de distintas moléculas en ambos tipos celulares en la misma preparación (evitando por tanto las variaciones en la tinción que en ocasiones se observa en tinciones de diferentes cubreobjetos). Para ello, se sembró el mismo número de células de ambos tipos celulares sobre el mismo cubreobjetos.

### **6.2 Inmunofluorescencias de cultivos 3D.**

Las inmunofluorescencias de los acinos formados por las células MCF10A cultivadas sobre matrigel se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Debnath *et al.*, 2003<sup>109</sup>. Las mamosferas se fijaron, 15 días después de sembrar las células, con paraformaldehído al 2% en PBS (pH 7,4) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron con una solución de PBS con 0,5% de Triton X-100 durante 10 minutos a 4°C. A continuación,



se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con un tampón de PBS/glicina (NaCl 130 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5 mM y glicina 100 mM) para decolorar el matrigel. La unión inespecífica de los anticuerpos se bloqueó con suero de caballo al 10% disuelto en un tampón denominado IF (NaCl 130 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5 mM, NaN<sub>3</sub> 7,7 mM, 0,1% de albúmina sérica bovina, 0,2% de Triton X-100 y 0,05% de Tween-20) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (**Tabla 3A**) se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente diluidos en la solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios (**Tabla 3B**), conjugados con fluorocromos, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente diluidos en la solución de bloqueo. A partir del bloqueo, todos los lavados se llevaron a cabo con el tampón IF (3 lavados de 20 minutos). Para contrateñir los núcleos, las mamóferas se incubaron en PBS con 0,5 µg/ml de DAPI durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS, se montaron con Mowiol. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia confocal (*LSM510 META ConfoCor 3 spectral*, Zeiss).

<b>A Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia</b>				
<b>Diana</b>	<b>Clon</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Dilución</b>
<b>RASA1</b>	B4F8	IgG de ratón	Santa Cruz sc-63	1:100
<b>NF1</b>	-	IgG de conejo	Santa Cruz sc-67	1:400
<b>ESR1</b>	MC-20	IgG de conejo	Santa Cruz sc-542	1:200
<b>p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)</b>	197G2	IgG de conejo	Cell Signaling #4377	1:400
<b>SB11</b>	324622	IgG de ratón	R&D Systems MAB2798	1:50
<b>ERAS</b>	D5G5J	IgG de conejo	Cell Signaling #12575	1:100
<b>Epítipo HA</b>	16B12	IgG de ratón	Biolegend #901501	1:500
<b>Epítipo HA</b>	C29F4	IgG de conejo	Cell Signaling #3724	1:1000
<b>Caspasa-3 activa (Asp175)</b>	-	IgG de conejo	Cell Signaling #9661	1:100
<b>Cadherina-E</b>	36/E-Cadherin	IgG de ratón	BD Transduction 610182	1:50
<b>Cadherina-N</b>	-	IgG de conejo	Abcam ab12221	1:100
<b>Colageno IV</b>	-	IgG de conejo	Abcam ab21295	1:500
<b>p53</b>	DO-7	IgG de ratón	Dako M7001	1:50
<b>p63</b>	BC4A4	IgG de ratón	Abcam ab735	1:50
<b>p73</b>	EP436Y	IgG de ratón	Abcam ab40658	1:150
<b>Queratina K5</b>	-	IgG de conejo	BioLegend #905501	1:1000
<b>Queratina K14</b>	LL002	IgG de ratón	Abcam ab7800	1:200
<b>Queratina K8</b>	M20	IgG de rata	SIGMA C5301	1:100
<b>Queratina K18</b>	CY-90	IgG de ratón	SIGMA C8541	1:200
<b>p120-catenina</b>	98/pp120	IgG de ratón	BD Transduction 610134	1:200
<b>β-catenina</b>	14	IgG de ratón	BD Transduction 610153	1:200
<b>Integrina-β1</b>	EP1041Y	IgG de conejo	Abcam 52971	1:200
<b>Integrina-α6</b>	GoH3	IgG de rata	Pharminogen 555735	1:200
<b>α-SMA</b>	1A4	IgG de ratón	SIGMA C-6198	1:200
<b>Fibronectina</b>	FBN11	IgG de ratón	NeoMarkers #MS-1351-R7	Listo para usar
<b>Otros análisis</b>				
<b>Faloidina-Atto 590</b>	-	-	SIGMA 93042	1:2000



<b>B Anticuerpos secundarios de inmunohistoquímica</b>				
Diana	Isotipo	Conjugado	Procedencia	Dilución
IgG de conejo	IgG de burro	Biotina	JACKSON Nº 711-065-152	1:1000
IgG de ratón	IgG de burro	Biotina	JACKSON Nº 715-065-151	1:1000
IgG de rata	IgG de burro	Biotina	JACKSON Nº 712-065-153	1:1000
<b>Anticuerpos secundarios de inmunofluorescencia</b>				
IgG de conejo	IgG de cabra	AlexaFluor488	Molecular Probes A11008	1:1000
IgG de ratón	IgG de cabra	AlexaFluor488	Molecular Probes A11001	1:1000
IgG de rata	IgG de cabra	AlexaFluor488	Molecular Probes A11006	1:1000
IgG de conejo	IgG de cabra	AlexaFluor594	Molecular Probes A11012	1:1000
IgG de ratón	IgG de cabra	AlexaFluor594	Molecular Probes A11005	1:1000
IgG de rata	IgG de cabra	AlexaFluor594	Molecular Probes A11007	1:1000

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.** A. Anticuerpos primarios y otros análisis. B. Anticuerpos secundarios.

## 7. Ensayos de proliferación.

Para cuantificar y comparar la proliferación celular entre las distintas líneas celulares, se empleó un kit colorimétrico basado en la metabolización de la sal de tetrazolio XTT (*Cell Proliferation Kit II (XTT)*; Roche). Para estos ensayos, se sembraron 4.000 células por sextuplicado en placas de 96 pocillos para cada línea celular y por cada día de experimento. Los valores de absorbancia (a 492 nm) se midieron cuatro horas después de añadir el compuesto. Los valores de absorbancia del primer día después de sembrar las células se tomaron como referencia para la normalización de los datos. La absorbancia se midió empleando un lector de microplacas Genios Pro (Tecan). Para las células MCF10A, estos ensayos se llevaron a cabo con medio completo y con medio reducido (2% de suero y sin EGF). Todos los ensayos de proliferación se realizaron, al menos, por triplicado en experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron con el test “t” de Student.

## 8. Ensayos de migración: cicatrización de heridas en placa.

Los ensayos de migración *in vitro* se basaron en la cuantificación de la cicatrización de heridas en placa<sup>114</sup>. Para ello, se sembraron 300.000 células por triplicado en placas de seis pocillos para cada línea celular y se cultivaron durante 48 horas hasta la confluencia. Se realizaron dos heridas por pocillo usando puntas de pipeta de 10 µl. Se tomaron 6 imágenes para cada tipo celular a tiempo 0, así como 24 y 48 horas tras realizar la herida, en los mismos puntos. Las imágenes se tomaron con un microscopio óptico (Olympus IX70) y una cámara digital (Optikam Pro Cool 5). El área de migración en los bordes de la herida se cuantificó mediante el programa informático Image J. Durante todos los días del experimento no se añadió medio fresco con el objetivo de no estimular la proliferación celular; por lo tanto, antes de realizar las heridas y antes de tomar las imágenes cada día, el medio de cada pocillo fue

retirado y filtrado (con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ ) y, tras lavar las células con PBS, fue reincorporado en cada pocillo. Todos los ensayos de migración se realizaron, al menos, por triplicado en experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron con el test “t” de Student.

## 9. Ensayos de invasión.

Los ensayos de invasión se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*BioCoatMatrigel Invasion Chambers*; BD biosciences). Se llevaron a cabo ensayos de migración e invasión de forma paralela usando cámaras de Boyden (sin y con matrigel, respectivamente). Tras rehidratar el matrigel, se sembraron 25.000 células de cada tipo celular, por duplicado, en cada tipo de cámara y se incubaron durante 24 horas. Tras eliminar las células del lado interno de la cámara, se procedió a su fijación con metanol, tinción con azul de toluidina al 0,5% y a su posterior montaje sobre portaobjetos. Se cuantificaron 5 campos por cámara mediante el uso de un microscopio óptico (Olympus BX41). Se calculó el porcentaje de invasión de cada línea celular empleando la siguiente fórmula: (media de células que invadieron/ media de células que migraron) x 100. El índice de invasión fue expresado como el ratio entre el porcentaje de invasión de las células a testar y el porcentaje de invasión de las células control.

## 10. Análisis por citometría de flujo.

### 10.1 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Para analizar el ciclo celular mediante citometría de flujo, se sembraron 50.000 células de cada tipo celular por triplicado en placas de seis pocillos. Cuando las células alcanzaron los diferentes estados de confluencia (baja, 40-50%, y elevada, 85-90%), se tripsinizaron, se fijaron con etanol frío al 70% y se conservaron a 4°C durante toda la noche. Después, las células se lavaron con PBS y se incubaron con una disolución de PBS, 0,05% de NP40 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DAPI durante 4 horas a 4°C. Los datos fueron adquiridos con un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences) y analizados mediante el programa FlowJo (Treestar). Estos ensayos se realizaron, al menos, por duplicado en experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron con el test “t” de Student.

### 10.2 Análisis de marcadores de superficie mediante citometría de flujo.

Para cuantificar la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo, se sembraron 150.000 células por triplicado en placas de seis pocillos. Cuando las células alcanzaron el 70-80% de confluencia, se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se incubaron con

los anticuerpos primarios listados abajo (**Tabla 4**) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se añadió DAPI (1 µg/ml de concentración final). Los datos fueron adquiridos con un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences) y analizados mediante el programa FlowJo (Treestar). Estos ensayos se realizaron, al menos, por duplicado en experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron con el test “t” de Student.

Diana	Clon	Fluorocromo	Procedencia	Dilución
CD44	J.173	FITC	Beckman Coulter IM1219U	20µl/1x10 <sup>6</sup> células
CD24	ML5	PE	BD Pharmingen™ 555428	20µl/1x10 <sup>6</sup> células
CD49f	GoH3	PE	BD Pharmingen™ 555736	20µl/1x10 <sup>6</sup> células
EpCAM	VU-1D9	FITC	Stem Cell Technologies #10109	20µl/1x10 <sup>6</sup> células
EpCAM	9C4	APC	BioLegend #324207	20µl/1x10 <sup>6</sup> células

**Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en citometría de flujo.**

## 11. Extracción de proteínas y análisis mediante western blot.

Los extractos proteicos de las líneas celulares fueron obtenidos mediante el raspado de las células en frío con PBS y su posterior resuspensión en un tampón de lisis (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, EGTA 10 mM, β-glicerofosfato 40 mM, 1% de Triton X-100, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas 1X (*cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) e inhibidores de fosfatasa 1X (*PhosSTOP*, Roche). Para las muestras de tejido de ratón, los tejidos congelados con nitrógeno líquido fueron homogeneizados en un mortero, seguido de 5 ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a 37°C en el tampón de lisis. La concentración proteica se determinó usando el método colorimétrico Bradford (BioRad Laboratories).

Una vez que las proteínas fueron reducidas y desnaturalizadas (β-mercaptoetanol y tampón Laemmli (BioRad), en relación 1:9, y hervidas durante 5 minutos a 95°C), se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de gradiente 4-15% (BioRad) usando un tampón de Tris/Glicina/SDS (Tris 25 mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%; pH 8,3; BioRad). Para la electroforesis, se emplearon entre 20 y 50 µg de proteína total de cada muestra (dependiendo del ensayo) y un marcador de peso molecular (BioRad). A continuación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) empleando el sistema “*Trans-Blot Turbo Transfer*” de BioRad. Para ello se empleó un tampón de transferencia (BioRad) con un 20% de etanol absoluto. La transferencia se realizó usando el protocolo MIXED MW (2,5 A, 25 V, 7 minutos). Una vez realizada la transferencia, las membranas se incubaron con un tampón de bloqueo (PBS con un 5% de leche desnatada en polvo y un 0,1% de Tween-20) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Los anticuerpos primarios (**Tabla 5**) se incubaron

durante toda la noche a 4°C en agitación diluidos en el tampón de bloqueo. Los anticuerpos de  $\beta$ -actina y GAPDH se usaron como controles de carga. Los anticuerpos secundarios (Tabla 5), conjugados con peroxidasa, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en agitación diluidos en el tampón de bloqueo. Se llevaron a cabo 3 lavados de 10 minutos con PBS tras la incubación de los anticuerpos. Para la detección de los anticuerpos secundarios, se empleó el “Clarity Western ECL” (BioRad) como sustrato de la peroxidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal se visualizó mediante un detector de quimioluminiscencia (ChemiDoc MP System, BioRad). La cuantificación de las bandas se llevó a cabo mediante el uso de los programas informáticos Quantity One o Image Lab (BioRad).

Anticuerpos primarios utilizados en western blot				
Diana	Clon	Isotipo	Procedencia	Dilución
RASA1	B4F8	IgG de ratón	Santa Cruz sc-63	1:200
NF1	-	IgG de conejo	Santa Cruz sc-67	1:200
p53	DO-7	IgG de ratón	Dako M7001	1:500
ERAS	D5G5J	IgG de conejo	Cell Signaling #12575	1:1000
ERAS	N-20	IgG de cabra	Santa Cruz sc-51077	1:200
Epítipo HA	C29F4	IgG de conejo	Cell Signaling #3724	1:1000
Cadherin-E	36	IgG de ratón	BD Transduction 610182	1:2000
Cadherina-N	-	IgG de conejo	Abcam ab12221	1:500
AKT	E45	IgG de conejo	Abcam ab32038	1:1000
p-AKT (Ser473)	193H12	IgG de conejo	Cell signaling #4058	1:500
p-AKT (Thr308)	244F9	IgG de conejo	Cell Signaling #4056	1:500
p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	197G2	IgG de conejo	Cell signaling #4377	1:500
ERK 2	C-14	IgG de conejo	Santa Cruz sc-154	1:500
p-S6 Ribosomal (Ser235/236)	-	IgG de conejo	Cell Signaling #2211	1:1000
S6 Ribosomal	54D2	IgG de ratón	Cell Signaling #2317	1:1000
p-GSK3 $\beta$ (Ser9)	-	IgG de conejo	Cell Signaling #9336	1:1000
p-mTOR (Ser2448)	-	IgG de conejo	Cell Signaling #2971	1:500
mTOR	Y391	IgG de conejo	Abcam ab32028	1:1000
p110 $\alpha$	C73F8	IgG de conejo	Cell Signaling #4249	1:1000
p100 $\beta$	C33D4	IgG de conejo	Cell Signaling #3011	1:1000
p85 $\alpha$	19H8	IgG de conejo	Cell Signaling #4257	1:1000
$\beta$ -Actina	I-19	IgG de cabra	Santa Cruz sc-1616	1:500
GAPDH	FL-335	IgG de conejo	Santa Cruz sc-25778	1:500
Anticuerpos secundarios de western blot				
Diana	Isotipo	Conjugado	Procedencia	Dilución
IgG de conejo	IgG de burro	HPR	GE Healthcare NA934	1:5000
IgG de ratón	IgG de burro	HPR	JACKSON Nº 715-035-151	1:5000
IgG de cabra	IgG de burro	HPR	Santa Cruz sc-2020	1:10000

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en western blot.

## 12. Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa.

El ARN total de las líneas celulares fue obtenido mediante el raspado de las células con Qiazol (Qiagen). El ARN se extrajo por separación de fases usando cloroformo y se purificó

usando las columnas del kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN fue eliminado mediante el uso del kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen). El ARN total de las muestras tumorales humanas fue aislado desde secciones de tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina. Para ello, se empleó la solución de desparafinización de Qiagen y el ARN se purificó usando las columnas del kit *miRNeasy FFPE* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

La reacción de transcripción inversa del ARNm para generar el ADN complementario se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN, empleando para ello el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para la retrotranscripción de los microARNs, se emplearon 10 ng de ARN total por reacción y se usó el kit *MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Ambas reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La RT-PCR cuantitativa fue realizada con el sistema *7500 Fast Real Time PCR* y se utilizó el programa de amplificación estándar. Para los análisis de expresión de ARNm y la cuantificación relativa del número de copias a partir de ADN, se empleó el *GoTaq PCR Master Mix* (Promega). Se emplearon 10 ng de ADN complementario o ADN genómico por reacción y ambos cebadores se usaron a una concentración final de 0,5 µM (**Tabla 6**). Para el análisis de expresión de los microARNs se empleó el *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y sondas *TaqMan* (**Tabla 6**).

Cebadores utilizados para la RT-PCR cuantitativa			
Cebador directo	Secuencia	Cebador inverso	Secuencia
ERAS-F	5'-ACCCCTCGTCTCTGATCCA-3'	ERAS-R	5'-ACTTGTTGCCACGAGGA-3'
SNAI1-F	5'-GCTGCAGGACTCTAATCCAGA-3'	SNAI1-R	5'-ATCTCCGGAGGTGGGATG-3'
SNAI2-F	5'-TTCGGACCCACACATTACCT-3'	SNAI2-R	5'-TTGGAGCAGTTTTGCACTG-3'
ZEB1-F	5'-TTTTCTGAGGCACCTGAA-3'	ZEB1-R	5'-TGAAATGCATCTGGTGTCC-3'
ZEB2-F	5'-AGGAGCTGTCTCGCCTTG-3'	ZEB2-R	5'-GGCAAAAGCATCTGGAGTTC-3'
TWIST1-F	5'-GGGCCGGAGACCTAGATG-3'	TWIST1-R	5'-TTTCCAAGAAAATCTTTGGCATA-3'
TBP-F	5'-AGTGAAGAACAGTCCAGACTG-3'	TBP-R	5'-CCAGGAAATAACTCTGGCTCAT-3'
GusB-F	5'-CGCCCTGCCTATCTGTATTC-3'	GusB-R	5'-TCCCACAGGGAGTGTGTAG-3'
ROR-1-F	5'-CCTCATCATGGAACATCTCAAG-3'	ROR-1-R	5'-AGTGCAGTTCTGCTGTCTGG-3'
WNT5A-F	5'-ATTGTACTGCAGGTGTACCTTAAAC-3'	WNT5A-R	5'-CCCCCTTATAAATGCAACTGTTTC-3'
NOTCH1-F	5'-CGCACAAGGTGTCTTCCAG-3'	NOTCH1-R	5'-AGGATCAGTGGCGTCTGTG-3'
NOTCH2-F	5'-AAAGTCAATCGTTTCCAGTGC-3'	NOTCH2-R	5'-CAATATCAATCTGGCAAACCTGG-3'
HES1-F	5'-GAAGCACCTCCGGAACCT-3'	HES1-R	5'-GTCACCTCGTTCATGCACTC-3'
HEY1-F	5'-CATACGGCAGGAGGAAAG-3'	HEY1-R	5'-GCATCTAGTCCTTCAATGATGCT-3'
Titina-F	5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3'	Titina-R	5'-TTCAGTCATGCTGCTAGCGC-3'

Sondas utilizadas para la RT-PCR cuantitativa de microARNs (TaqMan)		
miARN diana	Identificación de la sonda	Secuencia diana
miR-200c	hsa-miR-200c ID 002300	5'-UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA-3'
miR-141	hsa-miR-141 ID 000463	5'-UAAACACUGUCUGGUAAGAUGG-3'
miR-205	hsa-miR-205 ID 000509	5'-UCCUUCAUUCCACCGAGUCUG-3'
RNU48	RNU48 ID 001006	5'-GAUGACCCAGGUAACUCUGAGUGUGUCGUGAUGCAUACCCGACGCUCUGACC-3'

**Tabla 6. Cebadores y sondas utilizados en RT-PCR cuantitativa.**



Para la normalización de los niveles de expresión génica en los extractos celulares, se utilizó la expresión del gen *TBP* para el ARNm y la expresión de *RNU48* para los microARNs. Para normalizar el número de copias relativas a partir de ADN se utilizó como referencia el gen *Ttn* del ratón. Las muestras de tejido humano fijadas en paraformaldehído y embebidas en parafina se normalizaron usando la combinación de la expresión de los genes *TBP* y *GUSB*. La determinación de que esta combinación de genes son un buen control endógeno para la normalización se realizó mediante los programas informáticos NormFinder<sup>115</sup> y geNorm<sup>116</sup>.

### 13. Análisis masivo de expresión génica.

Para los análisis masivos de expresión génica, se extrajo el ARN de células en estado de subconfluencia como se describe en el apartado 12 de esta sección. Para los análisis de expresión génica diferencial se utilizaron los “microarrays” de ADN HTA 2.0. de Affymetrix. Estos análisis se llevaron a cabo en la Unidad Genómica del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca. Los datos se normalizaron mediante RMA usando “*Expression Profiler*” (Affymetrix) y la expresión diferencial se determinó mediante el programa TAC (Affymetrix). Los análisis de ontología génica se realizaron empleando el portal Toppgene<sup>117</sup>. La comparación de los patrones de expresión génica con otras firmas moleculares se realizó usando el programa GSEA<sup>118</sup> (“*Gene Set Enrichment Analysis*”).

### 14. Análisis bioinformáticos.

Para la mayoría de los análisis bioinformáticos se empleó la base de datos “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA), accesible en parte a través del “*cBioPortal for Cancer Genomics*” ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org))<sup>47,119</sup>. Para análisis del número de copias, se utilizó la cohorte de muestras incluidas en el estudio “*Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Cell 2015)*” y se seleccionó el conjunto de casos “*Tumor Samples with sequencing and CNA data (816)*”. Todos los análisis subsecuentes se llevaron a cabo usando los datos y las herramientas proporcionadas en *cBioPortal*. Los datos del número de copias de *RASA1* y *NF1* (GISTIC<sup>120</sup>; del inglés “*Genomic Identification of Significant Targets in Cancer*”), las mutaciones del gen *TP53*, los datos de expresión génica (RNA-seq), de expresión de proteínas (RPPA; del inglés “*Reverse Phase Protein Array*”) y de metilación (HM450; “*Human Methylation 450*”) se descargaron desde el repositorio “*Broad Institute*” (<http://gdac.broadinstitute.org>) y fueron procesados mediante los programas informáticos Microsoft Excel y GraphPad Prism. Las diferencias estadísticas entre el número de copias de *RASA1* en cada subgrupo tumoral se determinaron mediante análisis de contingencia (test exacto de Fisher o test Chi-cuadrado), mientras que las

diferencias existentes entre los niveles de expresión de ARN, proteína y metilación asociadas con el número de copias de *RASA1* se determinaron con el test “*t*” de Student. La relación entre la pérdida alélica de *RASA1* y la mutación del gen *TP53* en cada subgrupo se determinó con el test exacto de Fisher.

Para los análisis realizados a través de la herramienta online GOBO<sup>121</sup> (“*Gene Expression-Based Outcome for Breast Cancer Online*”; <http://co.bmc.lu.se/gobo>), se estratificaron los tumores de acuerdo a su clasificación según la firma PAM50, su estatus ESR1 y su grado histológico de malignidad. Se emplearon los datos estadísticos suplementados por defecto por esta herramienta.

Para los análisis de los niveles de expresión de *ERAS*, los datos de expresión (RNA-seq) y metilación (HM450K) de las muestras normales y tumorales se descargaron de la base de datos TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaCancerDetails.jsp?diseaseType=BRCA&diseaseName=Breast%20invasive%20carcinoma>). Se consideró expresión de *ERAS* en las muestras tumorales cuando los niveles de expresión fueron superiores a dos desviaciones estándar por encima del valor medio de expresión de las muestras control. Los datos de expresión de los subtipos PAM50 y el estatus ESR1 se obtuvieron a través del *cBioPortal* utilizando la cohorte de muestras incluidas en el estudio “*Breast Invasive Carcinoma (TCGA, Cell 2015)*”. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de contingencia (test exacto de Fisher) cuando se comparó el número de tumores con expresión de *ERAS* en cada subgrupo tumoral, y con el test “*t*” de Student cuando se compararon los niveles de expresión de todos los tumores en cada subgrupo. Se identificaron 5 sondas del “*array*” de metilación HM450K próximas al locus *ERAS* con datos de metilación en esta cohorte de tumores. El grado de metilación en las diferentes regiones CpG se expresó como valores beta, que van desde 0 (desmetilado) a 1 (completamente metilado). Las diferencias estadísticas entre los niveles de metilación para cada sonda entre el tejido normal y tumoral se determinaron con el test “*t*” de Student, mientras que la correlación entre los niveles de expresión y el grado de metilación se determinó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

## 15. Experimentación animal.

Los ratones se mantuvieron con una dieta estándar para roedores (con comida y agua *ad libitum*) y bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las leyes y regulaciones Europeas y Españolas (Convenio Europeo ETS 123 sobre la protección de los animales vertebrados utilizados con

finés experimentales u otros fines científicos; Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia), y fueron aprobados por el Comité Ético del CIEMAT (OEBA-CIEMAT), por el Órgano Habilitado y por la autoridad competente (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, Comunidad de Madrid; Proex 035/13 para los xenoinjertos ortotópicos de células mamarias humanas y Proex 087/15 para todos los experimentos relacionados con los animales K5-ERAS). Los ratones fueron eutanasiados en una cámara de CO<sub>2</sub>, siguiendo las regulaciones de FELASA y del OEBA-CIEMAT, cuando alcanzaron los criterios establecidos de punto final.

### 15.1 Xenoinjertos ortotópicos en la glándula mamaria.

Llevamos a cabo los experimentos de xenoinjerto ortotópico en la glándula mamaria con las células MCF10A y MDA-MB-231. Para ello, se inyectaron bilateralmente 1 millón de células MCF10A y 2,5 millones de células MDA-MB-231 en la almohadilla adiposa de la cuarta glándula mamaria de ratones hembra FoxN1<sup>nu/nu</sup> de aproximadamente 8 semanas de edad. Las células fueron inyectadas con matrigel ("*Basement Membrane Matrix High Concentration*", BD Biosciences) en un ratio 1:1 y en un volumen final de 100 µl. Para ello, se empleó una jeringa de 1ml y una aguja de 25G. La inyección se llevó a cabo por vía parenteral, aproximadamente 1 cm caudal al cuarto pezón.

En el caso de las células MDA-MB-231, el tamaño de los tumores fue medido los días 15, 19, 23 y 27 tras la inyección usando un calibre. El volumen de los tumores se calculó como  $4\pi/3 \times (\text{longitud}/2 \times (\text{anchura}/2)^2)$ . El experimento de xenoinjerto ortotópico con las células MDA-MB-231 control y MDA-MB-231-ERAS se llevó a cabo por duplicado, inyectándose 6 animales bilateralmente para cada grupo celular en cada experimento. En uno de los experimentos, los tumores fueron extirpados quirúrgicamente el último día (día 27 post-inyección) y, un mes más tarde, los ratones fueron sacrificados para evaluar la capacidad metastásica de las células. Las diferencias estadísticas en el crecimiento tumoral, así como en el peso de los tumores, se determinaron con el test "*t*" de Student.

Para el procedimiento quirúrgico, los animales fueron anestesiados con dexmedetomidina (agonista selectivo de los receptores alfa-2 adrenérgicos; 1 mg/Kg; Dexdomitor, Pfizer) y ketamina (anestésico disociativo; 75 mg/Kg; Imalgène, Merial) inyectados por vía intraperitoneal. Como analgésico se empleó buprenorfina (0.5 mg/kg; Buprex, Quintiles) vía intraperitoneal. Para prevenir la aparición de queratitis, se empleó una pomada protectora para lubricar el ojo (Thea). El área quirúrgica fue higienizada mediante una solución de



povidona yodada al 10% y etanol al 70%. Para extirpar los tumores se empleó una tijera quirúrgica y unas pinzas de disección Adson Brown. Tras extirpar los tumores, la solución de continuidad de la piel fue cerrada realizando puntos de cirujano con una sutura no reabsorbible de seda trenzada y tamaño 5/0 con aguja traumática (Ethicon), empleando para ello un porta-agujas. Tras la intervención, se empleó atipemazol (2,5 mg/Kg; Antisedan, Pfizer), inyectado por vía intraperitoneal, como agente reversor de la dexmedetomidina.

## **15.2 Generación de líneas de ratones transgénicos.**

Para la generación de ratones transgénicos, se usaron técnicas estándar, según se describe en Hogan *et al*, 1994<sup>122</sup>.

### **15.2.1 Superovulación de hembras donantes.**

Las hembras donantes de embriones, de fondo genético (C57BL/6J x DBA/2J)-F1 (B6D2-F1) y 3-4 semanas de edad, se sometieron a un protocolo de superovulación. Para ello, se les inyectó una dosis de 5 UI de PMSG (Gonadotropina sérica de yegua gestante; “*Pregnant Mare’s Serum Gonadotropin*”) vía intraperitoneal para estimular el desarrollo de los folículos ováricos. 48 horas después, se les inyectó una dosis de 5 UI de hCG (Gonadotropina coriónica humana; del inglés “*human Chorionic Gonadotropin*”) por la misma vía para inducir la ovulación y, a continuación, se cruzaron con machos fértiles B6D2-F1 para la fecundación de los óvulos. A las 24 horas, las hembras fueron sacrificadas mediante dislocación cervical para la obtención de los embriones.

### **15.2.2 Extracción de embriones y microinyección.**

Para extraer los embriones de las hembras donantes, se diseccionaron ambos oviductos y se llevó a cabo su inmersión en una gota de medio M2 (Sigma). Con la ayuda de dos pinzas de disección de punta fina y una lupa binocular (Nikon SMZ 2B), se desgarró el ántrix y se libera el complejo cúmulo-ovocito al medio de cultivo. Con el objetivo de deshacer este cúmulo e individualizar los embriones, se añade hialuronidasa (0,3 mg/ml; Sigma) y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mediante el uso de una pipeta de cristal, se realizan varios lavados de los embriones para eliminar los restos del cúmulo. Posteriormente, se procede a la inyección de la secuencia de ADN transgénico en uno de los pronúcleos de los embriones mediante el empleo de un microscopio de microinyección (Nikon Diaphot TMD; micromanipuladores, Narishige MO-189). Tras la microinyección, los embriones se mantienen en la incubadora hasta el momento de la transferencia.

La secuencia de ADN transgénico empleado en la microinyección se obtuvo tras digerir el vector transgénico BK5-HA-hERAS (descrito en el apartado 4.1 de esta sección) con NotI, purificar la banda correspondiente mediante un gel de agarosa al 1% en TAE 1X y el uso de columnas de sílice (*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, Macherey-Nagel) y posterior purificación con columnas de intercambio iónico (*Elutip-D*, Schleicher & Schuell). El ADN se inyectó a una concentración aproximada de 2 ng/μl.

### 15.2.3 Transferencia de embriones y sincronización de hembras receptoras.

Una vez microinyectados los embriones, se procedió a su transferencia en las hembras receptoras (B6D2-F1 y 8-15 semanas de edad), las cuales deben estar en un estado de pseudogestación para que los embriones transferidos implanten correctamente. Para ello, las hembras se cruzaron con machos vasectomizados 24 horas antes de proceder a la transferencia, sincronizando así su ciclo con las hembras donantes. Las hembras receptoras se anestesiaron como se describe en el apartado 15.1 de esta sección. Una vez anestesiadas, se procedió a afeitar la región dorsolumbar con un cortapelos eléctrico y a la higienización de la zona. A continuación, se realizó una pequeña incisión en la línea media dorsal caudalmente al último par de costillas empleando unas tijeras. Esta incisión permite visualizar la grasa ovárica intraabdominal a ambos lados, determinando así el punto donde se realizará una nueva incisión para extraer el ovario a través de la pared muscular. De esta manera, el ovario y el oviducto quedan expuestos. Con la ayuda de dos pinzas de disección de punta fina y una lupa binocular (Nikon SMZ 2B), se desgarró la bolsa ovárica, se localiza el infundíbulo y se introduce la pipeta de cristal con los embriones, depositándolos en el ámpula. Finalmente, se reintroducen los ovarios en el abdomen y se procede al cierre de las incisiones como se describe en el apartado 15.1 de esta sección, con la excepción del empleo de una sutura reabsorbible para el cierre de la pared muscular.

Las líneas de animales transgénicos fueron establecidas mediante el cruce de los ratones fundadores con animales B6D2-F1, resultando en ratones con un fondo genético 50% B6 y 50% D2.

### 15.3 Monitorización de la aparición de tumores espontáneos.

Para determinar los periodos de aparición de tumores espontáneos en los ratones K5-ERAS, se llevó a cabo una revisión externa y generalizada de todos los animales K5-ERAS y a sus hermanos de camada control, al menos, dos veces por semana hasta el día de su sacrificio.

## **16. Genotipado de ratones transgénicos.**

El ADN empleado para el genotipado de los animales transgénicos se obtuvo a partir de la biopsia de la punta de la cola de los ratones, la cual se digirió con 700 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS 0,2%, NaCl 200 mM y proteinasa K 500 µg/ml) durante toda la noche a 55°C. El ADN fue precipitado con 500 µl de isopropanol, lavado con etanol al 70% y resuspendido en 500 µl de tampón TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

Los ratones fueron genotipados mediante análisis de PCR. Para identificar a los animales transgénicos se usaron un par de cebadores específicos (cebador directo 5'-TTCAGGGTGTGTTTAGAATGG-3' y cebador inverso 5'-CAATAAGAATATTTCCACGCCA-3') del intrón 2 del gen de la beta-globina del conejo, el cual está incluido en el transgén. Para amplificar la región comprendida entre estos cebadores se empleó un programa de PCR consistente en un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 50 segundos, llevándose a cabo una extensión final a 72°C durante 5 minutos. En la misma reacción, empleamos un par de cebadores de una secuencia endógena (perteneciente al gen *Fabpi*) como control de la presencia de ADN amplificable (cebador directo 5'-TGGACAGGACTGGACCTCTGCTTTCCTAGA-3' y cebador inverso 5'-TGGACAGGACTGGACCTCTGCTTTCCTAGA-3'). Los productos de PCR de ambas reacciones son de diferente tamaño, siendo posible su distinción tras la correspondiente electroforesis.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se empleó el kit de PCR *GoTaq Green Master Mix* (Promega). Por cada reacción de 10 µl se emplearon: 5 µl del *GoTaq Green Master Mix*, 3,4 µl de agua, 0,5 µl de los cebadores del intrón del gen de la beta-globina del conejo (10 µM cada uno) y 0,1 µl de los cebadores del gen *Fabpi* (10 µM cada uno) y 1 µl de ADN.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis. Para ello se empleó un gel de agarosa al 1% en tampón TBE (Tris-Borato-EDTA: Tris-borato 89 mM y EDTA 2 mM; pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/ml (Sigma). Además, se añadió un marcador de peso molecular para estimar el tamaño de los productos amplificados por la PCR (marcador de peso molecular de ADN IX, Roche). El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (*Gel Doc XR+ system*, BioRad) y mediante el programa informático *Quantity One* (BioRad).

## 17. Southern blot.

Para llevar a cabo el Southern blot, se extrajo el ADN a partir de una muestra de cola de los ratones tras su eutanasia y se digirió con 700 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 100 mM, SDS 1%, NaCl 100 mM y proteinasa K 500 µg/ml) durante toda la noche a 55°C. El ADN fue precipitado con 250 µl de NaCl saturado y con 500 µl de isopropanol, y fue lavado con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 100 µl de tampón TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

Para el análisis comparativo del número de copias del transgén K5-ERAS en las distintas líneas de ratones transgénicos, se digirieron 10 µg de ADN genómico de hermanos de camada de las 3 líneas de animales transgénicos con EcoRI y PstI (de forma independiente) y se realizó un Southern blot aplicando técnicas estándar<sup>123</sup>. Para ello, se realizó una transferencia alcalina en la que el ADN se transfirió a una membrana de nailon (Amersham Hybond-XL, GE Healthcare). La membrana se hibridó con una sonda del transgén K5-ERAS conteniendo dCTPs marcados con un isótopo radiactivo del fósforo ( $P^{32}$ ).

## 18. Tinción y montaje de la glándula mamaria completa (“Whole mount”).

Tras el sacrificio de los animales, se extrajeron las glándulas mamarias y se fijaron sobre portaobjetos con Carnoy's (fijador compuesto por un 60% de etanol absoluto, un 30% de  $CHCl_3$  y un 10% de ácido acético glacial) durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras la fijación, se procedió a rehidratar las muestras (15 minutos con etanol al 70%, 15 minutos con etanol al 50% y 5 minutos en agua destilada). Una vez hidratadas, se tiñeron con Carmine Alum (Carmine 4 mM y sulfato aluminico potásico 10 mM) a temperatura ambiente toda la noche. Después, las muestras fueron deshidratadas mediante concentraciones crecientes de etanol y se pasaron a Histoclear (un disolvente orgánico análogo del xileno; National Diagnostics). Las muestras se montaron empleando el medio de montaje Permount (Fisher Scientific) y las imágenes fueron tomadas con una lupa binocular (Olympus S7X9) y una cámara digital (Olympus DP22). Para los estudios morfológicos de la glándula mamaria durante la pubertad, gestación y lactación se usaron, al menos, dos animales de cada estadio y genotipo.

## 19. Análisis estadístico.

Los test estadísticos empleados para cada análisis se especifican en cada apartado de esta sección. En todos los casos, se consideraron diferencias significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05.



## ***Resultados -***

---



## Resultados -

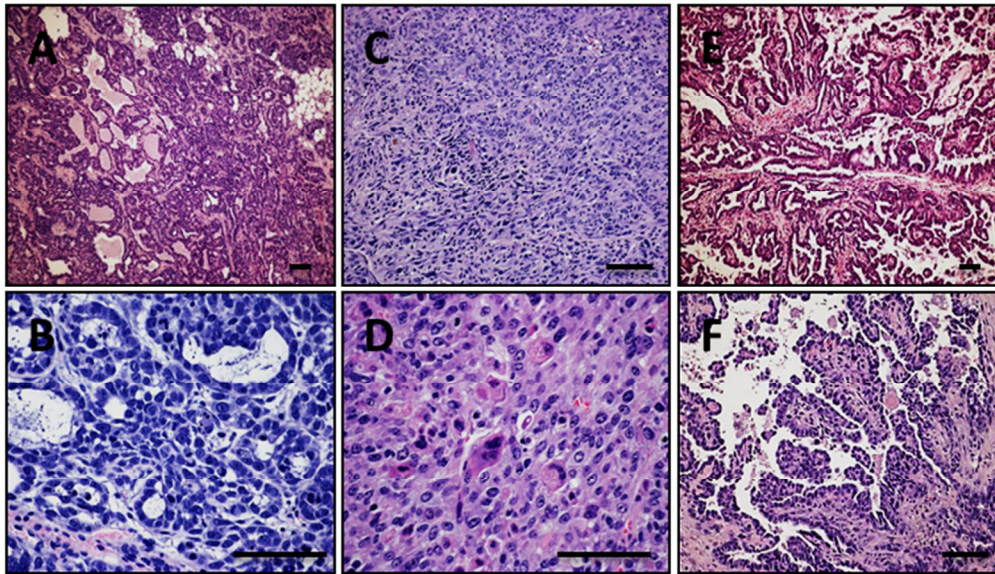
### 1. -Caracterización histológica y molecular de los tumores generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-.

Como se menciona en la introducción, en nuestro laboratorio se generó con anterioridad una colección de 37 tumores mamarios en animales con transposición; el estudio de las integraciones del transposón T2/Onc2 en estos tumores generó la lista de CIS indicada en la **tabla 2**. Con objeto de estudiar la presencia de correlaciones entre el subtipo tumoral y los genes mutados en cada tumor, caracterizamos histológica y molecularmente estos tumores. El análisis histopatológico de los tumores mamarios originados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/- reveló que todos eran carcinomas mamarios. Atendiendo a criterios morfológicos, estos carcinomas se clasificaron como alveolares, papilares, sólidos, tubulares o adenoescamosos. El 56% de los tumores SB/T2/p53+/- fueron carcinomas o adenocarcinomas alveolares. El 19% presentó un patrón mixto sólido-alveolar y el 12.5% fueron carcinomas o cistoadenocarcinomas papilares. Otros subtipos, como los carcinomas sólidos, tubulares o anaplásicos, fueron menos frecuentes. Por otro lado, dos de los cinco tumores mamarios desarrollados por los ratones SB/T2 fueron adenocarcinomas escamosos, mientras que solamente uno presentó un patrón sólido-alveolar, sugiriendo que la pérdida de p53 puede estar implicada en la morfología de los tumores mamarios de estos ratones (**Tabla 7 y Figura 9**). Sin embargo, no se encontró correlación entre las inserciones de los transposones en los genes *Rasa1*, *Nf1* y *Eras* con el subtipo histológico.

Clasificación histológica	SB/T2/p53+/-	SB/T2
Carcinoma alveolar	18	0
Carcinoma sólido-alveolar	6	1
Carcinoma adenoescamoso	0	2
Carcinoma papilar	2	1
Cistoadenocarcinoma papilar	2	0
Carcinoma sólido	1	0
Carcinoma tubular	1	0
Carcinoma alveolar-papilar	1	0
Carcinoma tubular-papilar	0	1
Carcinoma anaplásico	1	0
Total	32	5

**Tabla 7.** Clasificación histológica de los 37 tumores de mama generados en los ratones SB/T2/p53+/- y SB/T2.

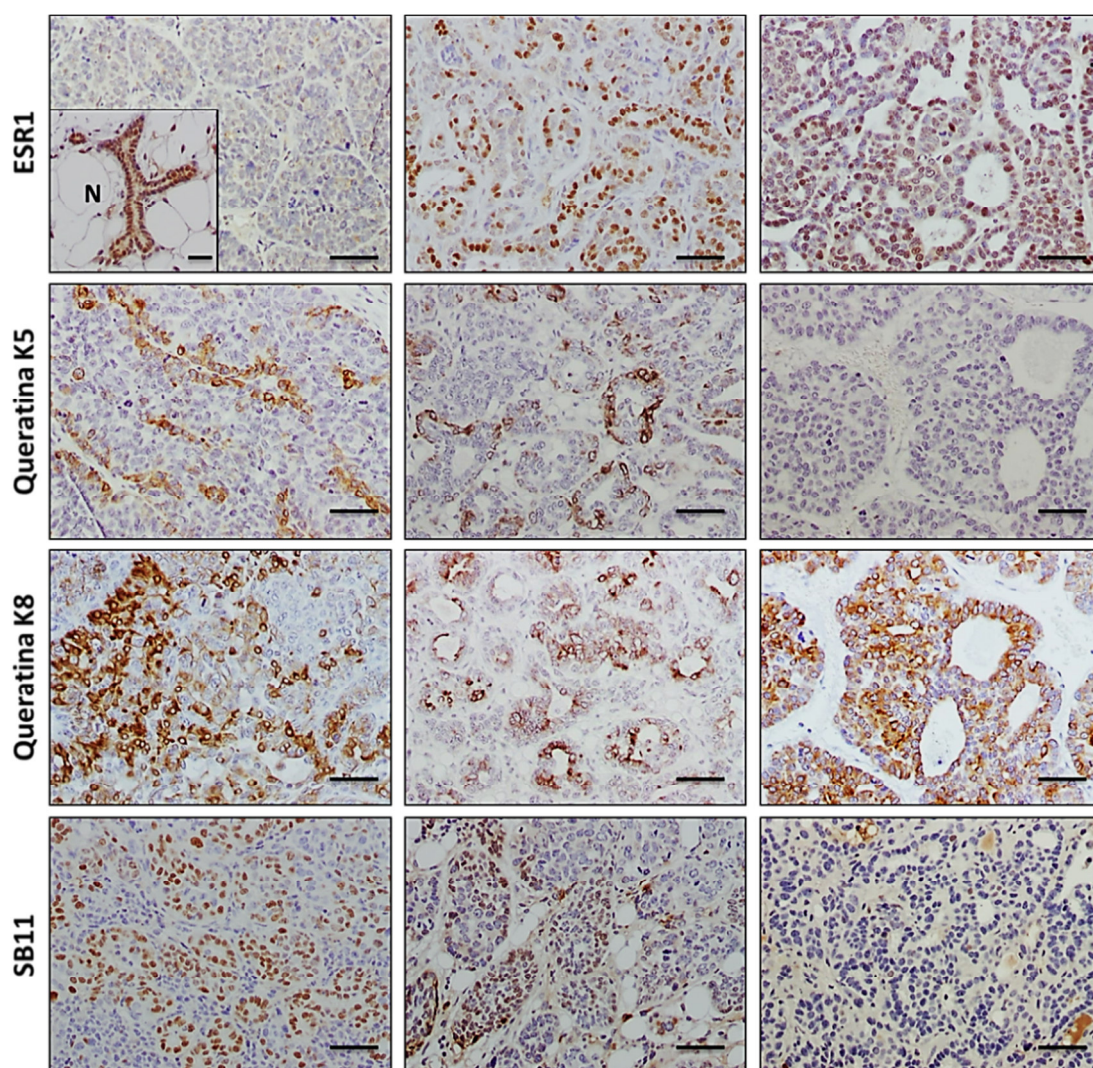




**Figura 9. Imágenes histológicas representativas de los subtipos más frecuentes de carcinomas mamarios en ratones con transposición.** Las imágenes A y B corresponden a tumores de tipo alveolar. Las imágenes C y D son regiones con un patrón sólido pertenecientes a carcinomas sólido-alveolares, mientras que E y F son imágenes de carcinomas papilares. Las barras representan 100  $\mu\text{m}$ .

Se llevó a cabo una caracterización molecular de los tumores mediante el análisis de la expresión de marcadores luminales y basales (como el receptor de estrógenos y las queratinas K8 y K5), así como de la expresión de la transposasa SB11. Esta caracterización se realizó en 31 tumores SB/T2/p53+/- y en 4 tumores SB/T2. Observamos que todos los tumores eran positivos para la queratina K8, mientras que solo el 49% expresaban la queratina K5. A pesar de que los tumores de mama originados en ratones son mayoritariamente independientes de estímulos hormonales, el 80% de estos carcinomas fueron positivos al receptor de estrógenos. Sin embargo, no encontramos correlaciones entre la expresión de estos marcadores y la inserción de transposones en los genes *Rasa1*, *Nf1* o *Eras* (no mostrado). No obstante, encontramos una correlación negativa entre los niveles de expresión de la queratina K5 (marcador de tumores de tipo basal) y el receptor de estrógenos (marcador de tumores luminales) ( $p < 0,01$ ), al igual que una correlación positiva entre los niveles de expresión de la queratina K5 y la transposasa SB11 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 10**).

En conclusión, no encontramos asociaciones entre la inserción del transposón en los genes *Rasa1*, *Nf1* o *Eras* con la morfología de los tumores generados en los ratones con transposición, ni con la expresión de los marcadores estudiados en estos tumores.



**Figura 10. Inmunohistoquímicas representativas de los tumores mamarios en ratones con transposición.** Las imágenes muestran la tinción inmunohistoquímica del receptor de estrógenos, las queratinas K5 y K8, y la transposasa SB11 en 3 tumores diferentes. La barra representa 50µm. N = tejido normal.

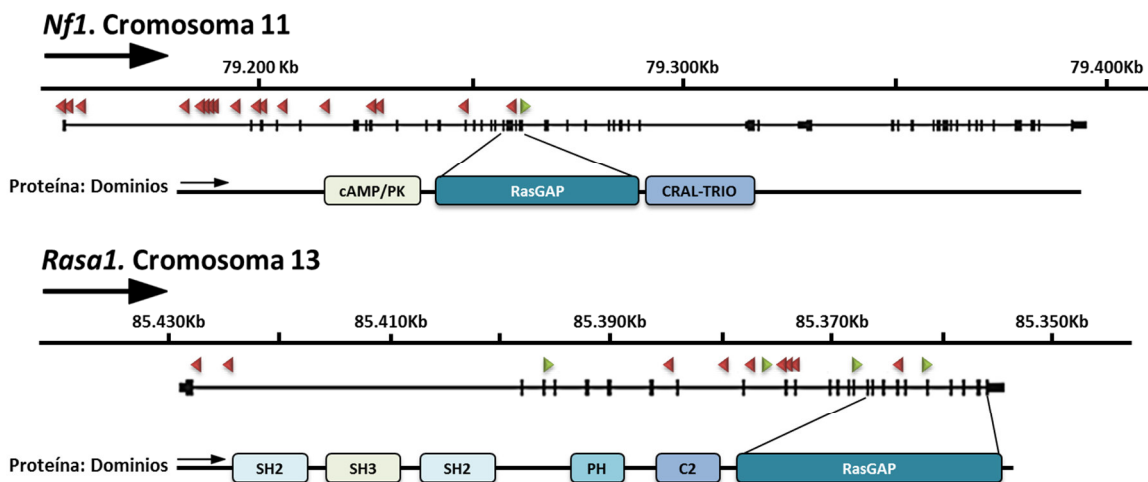
## 2. -Implicación de RASA1 en el cáncer de mama.

### 2.1 Análisis -de la expresión de RASA1 y NF1 en los tumores de mama generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-.

Los genes *Rasa1* y *Nf1*, ambos con función Ras-GAP, se encuentran entre los genes que están mutados por integraciones del transposón en un mayor número de tumores generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/- . De hecho, 21 de los 37 tumores analizados (57%) presentaron inserciones en uno o ambos genes Ras-GAP (**Tabla 2**; página 29), sugiriendo que la alteración de su expresión es un evento importante en el desarrollo de estos tumores. La posición y orientación del transposón T2/Onc2 respecto al gen en el cual se inserta proporciona un indicio del tipo de alteración producida en dicho gen<sup>124</sup>. El análisis de la

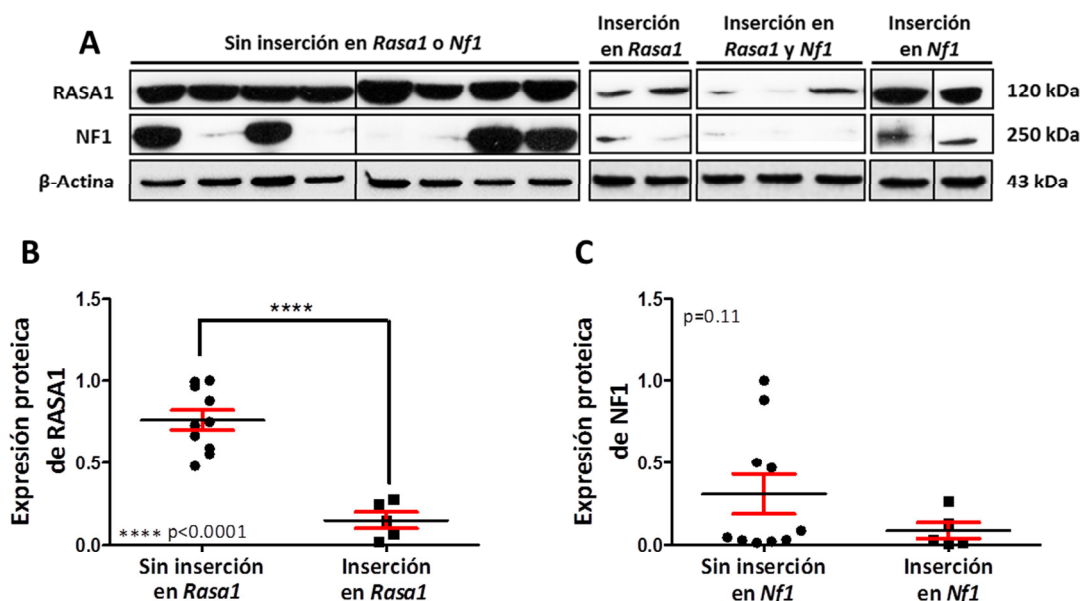


orientación de los transposones en estos genes mostró que el 94% (17 de 18) de las inserciones en *Nf1* y el 69% (9 de 13) de las inserciones en *Rasa1* tuvieron lugar en la orientación opuesta a la dirección transcripcional del gen. Además, en ambos genes todas las inserciones se localizaron antes o dentro del dominio funcional Ras-GAP (**Figura 11**). En su conjunto, estos datos sugieren que las integraciones del transposón conllevan la pérdida de función de *Nf1* Y *Rasa1*, y que esta disrupción induce una selección positiva de las células, dando lugar al desarrollo y/o progresión de los tumores mamarios.



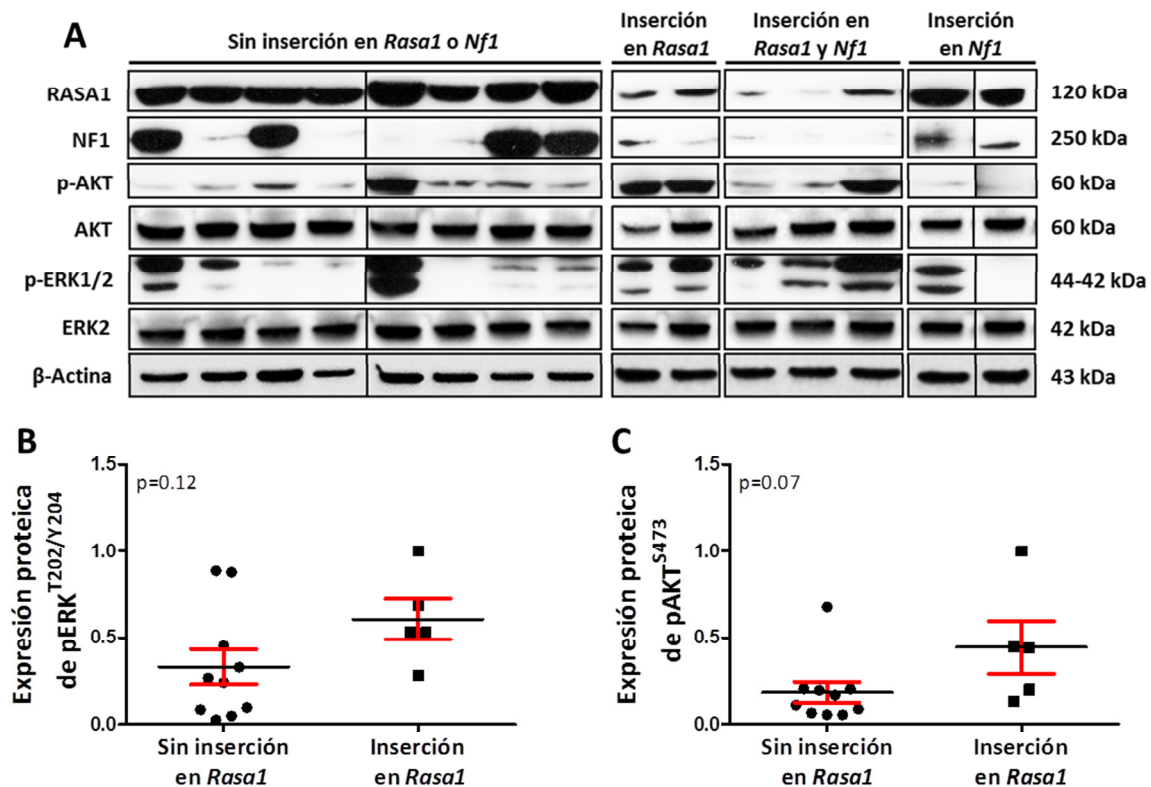
**Figura 11.** Sitios de integración del transposón T2/Onc2 en los genes *Rasa1* y *Nf1* en los tumores mamarios de los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/- . Estructura de los genes de ratón *Rasa1* y *Nf1* donde se muestra la localización de la inserción de los transposones. Los triángulos representan la orientación del transposón en cada localización (en verde se muestran las inserciones que tienen la misma dirección transcripcional que el gen, mientras que en rojo se muestran aquellas con orientación opuesta). Debajo de cada gen se representan los dominios funcionales de cada proteína, delimitándose los exones correspondientes al dominio Ras-GAP. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Para validar si la inserción del transposón T2/Onc2 en los genes *Nf1* y *Rasa1* resulta en una alteración de su expresión, analizamos algunos de estos tumores mediante western blot (**Figura 12A**). A pesar de la elevada heterogeneidad de los tumores, hubo una excelente correlación entre la presencia de inserciones del transposón en el gen *Rasa1* y los niveles de expresión de la proteína RASA1 ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 12B**). En el caso de *Nf1*, todos aquellos tumores con inserción en este gen mostraron niveles reducidos de expresión de la proteína por western blot; sin embargo, algunos de los tumores sin inserción en *Nf1* también presentaron niveles bajos de expresión (**Figura 12C**), sugiriendo la inactivación de la expresión de *Nf1* por otros mecanismos independientes de la inserción del transposón.



**Figura 12. Inactivación de los genes *Rasa1* y *Nf1* por la integración del transposón T2/Onc2.** A. Expresión proteica de RASA1 y NF1 en tumores mamarios inducidos por la inserción de transposones. Las muestras se agrupan de acuerdo con la inserción del transposón en los genes *Rasa1*, *Nf1*, ambos o ninguno B. Cuantificación relativa de la expresión de RASA1 en los tumores sin y con inserción del transposón en el gen *Rasa1*. C. Cuantificación relativa de la expresión de NF1 en los tumores sin y con inserción del transposón en el gen *Nf1*. Las gráficas B y C se normalizaron usando la expresión de la β-actina.

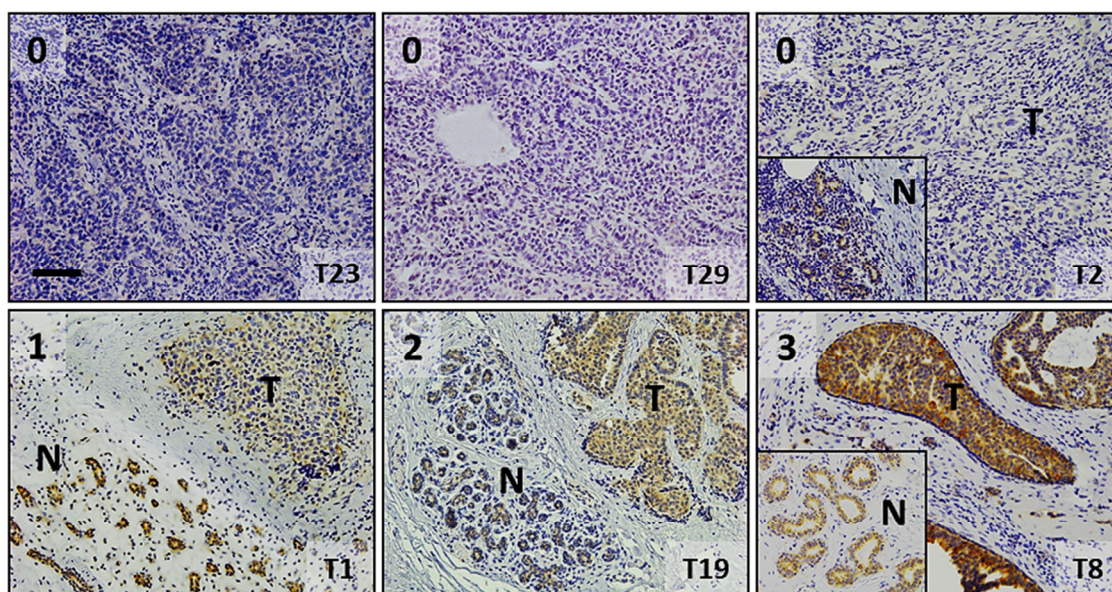
Dado que la disrupción de *Rasa1* y *Nf1* y la consiguiente pérdida de su actividad Ras-GAP debería resultar en una mayor actividad de la vía de señalización de Ras, analizamos la activación de ERK (un conocido efector de Ras) y AKT (un efector de Ras y de PI3K) en estos tumores. Medimos la activación de ERK mediante la cuantificación de las proteínas ERK1 y ERK2 fosforiladas (y por lo tanto activas) en los residuos Thr202 y Tyr204 respectivamente, y la activación de AKT mediante la cuantificación de la proteína fosforilada en el residuo Ser473. Cuando comparamos la activación de estos efectores en los tumores con y sin inserción en el gen *Rasa1*, y a pesar de la elevada heterogeneidad de los mismos, observamos que en ambos casos existía una tendencia hacia una mayor activación de la vía de Ras en aquellos que presentaban inserción en *Rasa1* (Figura 13).



**Figura 13. Activación de la vía de señalización de Ras en los tumores con inserción del transposón en los genes *Rasa1* y *Nf1*.** A. Activación de p-ERK<sup>T202/Y204</sup> y p-AKT<sup>S473</sup> en los tumores mamarios inducidos por la inserción de transposones. Las muestras se agrupan de acuerdo con la inserción del transposón en los genes *Rasa1*, *Nf1*, ambos o ninguno. B. Cuantificación relativa de la fosforilación de ERK1/2 en los residuos Thr202 y Tyr204 en los tumores sin y con inserción del transposón en el gen *Rasa1*. C. Cuantificación relativa de la fosforilación de AKT en el residuo Ser473 en los tumores sin y con inserción del transposón en el gen *Rasa1*. Las gráficas B y C se normalizaron usando la expresión de ERK2 y AKT total, respectivamente.

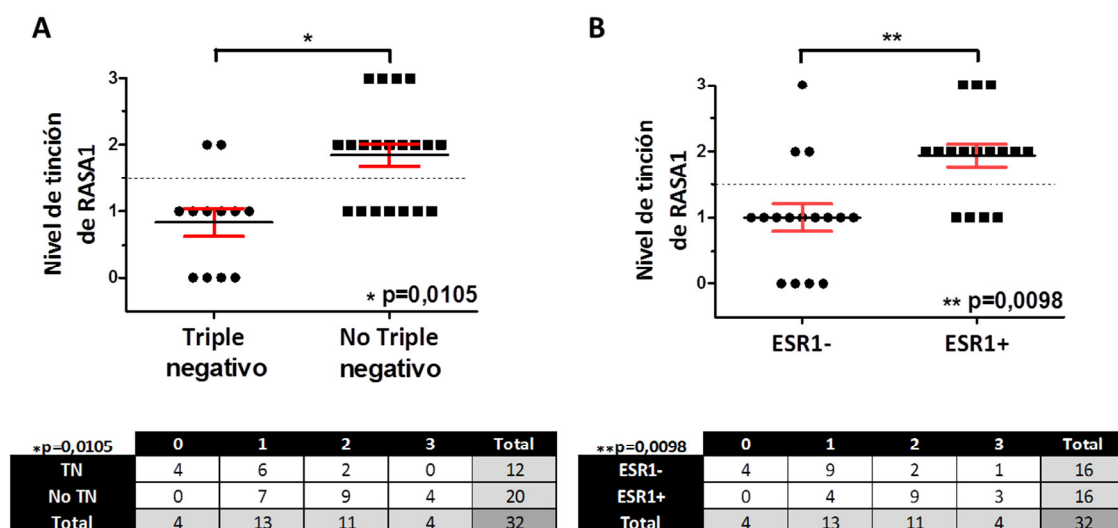
## 2.2 Alteraciones del gen *RASA1* en los tumores de mama humanos.

Mientras que *NF1* es un gen supresor tumoral bien conocido, y sus delecciones y mutaciones en el cáncer de mama han sido descritas por otros durante el desarrollo de esta tesis doctoral<sup>87,88,94</sup>, el papel de *RASA1* en el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama no ha sido descrito hasta el momento. Con el fin de evaluar la expresión de *RASA1* en los tumores humanos, llevamos a cabo la tinción inmunohistoquímica de esta proteína en una colección de 32 tumores humanos en la que estaban representados todos los subtipos moleculares. La intensidad de la tinción de *RASA1* en las regiones tumorales fue comparada con la intensidad en el tejido mamario normal en cada muestra, y fue cuantificada a ciegas mediante el uso de una escala arbitraria de 0 a 3 (correspondiendo el valor 0 a una tinción negativa y el valor 3 a una tinción intensa) (**Figura 14 y Anexo I**).



**Figura 14. Tinciones inmunohistoquímicas de tumores de mama humanos usando un anticuerpo contra RASA1.** Imágenes representativas de tinciones negativas, leves, moderadas e intensas (indicado en la esquina superior izquierda como 0, 1, 2 y 3, respectivamente) para RASA1 en varios tumores de mama. Los recuadros interiores representan diferentes campos en la misma muestra. N = tejido normal; T = tejido tumoral. El número del tumor se indica en la esquina inferior derecha. La barra representa 100µm. Todas las fotos están a la misma escala.

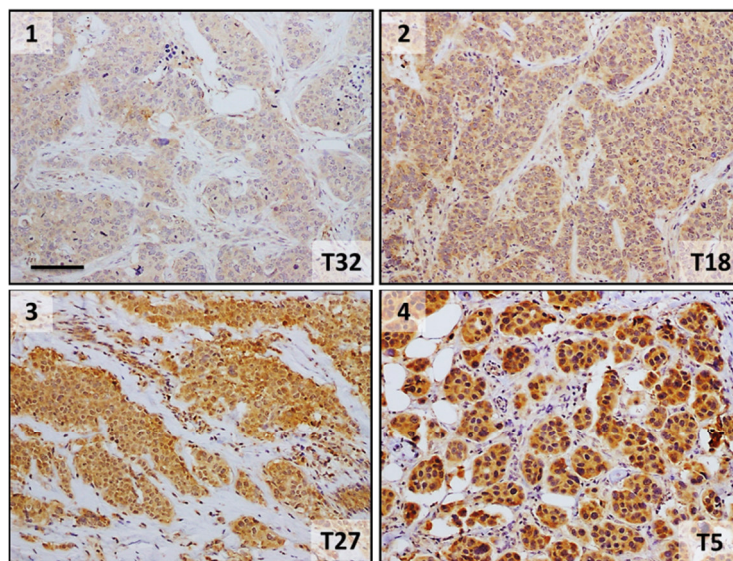
Cuando comparamos los niveles de tinción de RASA1 entre los distintos tipos moleculares, observamos que la expresión de RASA1 se encontraba reducida en los tumores de tipo basal o triple negativos respecto a los otros subtipos ( $p=0,0105$ ; **Figura 15A y Tabla 8**). Esta tendencia resultó más evidente cuando se compararon los niveles de tinción de RASA1 entre los tumores negativos y positivos al receptor de estrógenos ( $p=0,0098$ ; **Figura 15B y Tabla 8**).



**Figura 15. Relación entre los niveles de tinción de RASA1 y el subtipo tumoral.** A. Asociación entre la tinción relativa de RASA1 y los tumores triple negativos. B. Asociación de los niveles de tinción relativa de RASA1 y el estatus de ESR1. En A y B: Arriba observamos la distribución de los grados de tinción y abajo se muestran las tablas de contingencia entre el nivel de tinción de RASA1 y el subtipo triple negativo o el estatus de ESR1. TN = Triple negativo.



Por otro lado, también valoramos los niveles de expresión de NF1 en estos tumores. En contraste con RASA1, NF1 presentó una tinción intratumoral más heterogénea y no se observaron tumores con tinción negativa. Al igual que la tinción de RASA1, la tinción de NF1 fue cuantificada a ciegas mediante el uso de una escala arbitraria de 1 a 4 (correspondiendo el valor 1 a una tinción leve y el valor 4 a una tinción muy intensa). Dada la heterogeneidad de la tinción, se valoraron 5 campos independientes dentro de cada tumor y se halló la media de intensidad intratumoral (**Figura 16 y Anexo I**).



**Figura 16. Tinciones inmunohistoquímicas de tumores de mama humanos usando un anticuerpo contra NF1.** Imágenes representativas de tinciones leves, moderadas, intensas y muy intensas (indicado en la esquina superior izquierda como 1, 2, 3 y 4, respectivamente) para NF1 en varios tumores de mama. El número del tumor se indica en la esquina inferior derecha. La barra representa 100µm.

Cuando comparamos los niveles de tinción de NF1 dentro de los subtipos moleculares y con el estatus de ESR1, solo observamos una tendencia hacia una menor expresión de NF1 en los tumores negativos al receptor de estrógenos ( $p=0,047$ ; **Tabla 8**). Además, estudiamos la asociación de diversos parámetros clínicos (tales como el grado de malignidad histológico, el estadio clínico, la edad del diagnóstico, la recurrencia y la supervivencia global, entre otros) con los niveles de expresión de ambas proteínas. Hallamos una correlación entre los niveles bajos o nulos de expresión de RASA1 y la elevada tinción del marcador de proliferación celular Ki-67 ( $p=0,0239$ ), así como con los tumores de alto grado histológico de malignidad (G3;  $p=0,0068$ ) y de estadio clínico avanzado (estadio III;  $p=0,0245$ ). Sin embargo, no hallamos correlaciones entre los niveles de expresión de NF1 y los parámetros clínicos (**Tabla 8 y Anexo I**).

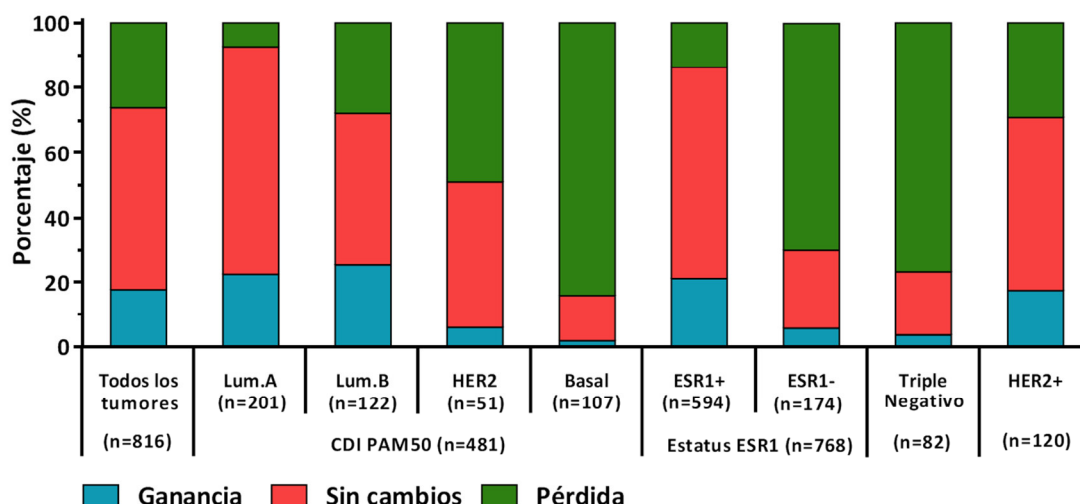
Datos clínicos	RASA1	NF1	Test estadístico
Subtipo molecular	p=0,0105	ns	Test Chi-cuadrado
Edad del diagnóstico (años)	ns	ns	Test "t" de Student
TNM	ND	ND	-
Estadio	p=0,0245	ns	Test Chi-cuadrado
Grado	p=0,0068	ns	Test Chi-cuadrado
Tamaño	ns	ns	Test Chi-cuadrado
Metástasis en nódulos linfáticos	ns	ns	Test exacto de Fisher
Estatus ESR1	p=0,0098	p=0,047	Test Chi-cuadrado
Estatus PGR	ns	ns	Test Chi-cuadrado
Estatus HER2	ns	ns	Test Chi-cuadrado
Estatus Ki-67	p=0,0239	ns	Correlación de Pearson
Recurrencia	ns	ns	Test Chi-cuadrado
Menopausia	ns	ns	Test Chi-cuadrado
Muerte	ns	ns	Test Chi-cuadrado
Supervivencia global	ND	ND	-

**Tabla 8. Asociación entre los niveles de expresión de RASA1 y NF1 mediante inmunohistoquímica y diversos parámetros clínicos.** Se muestra el p-valor y se especifica el test estadístico usado para cada parámetro. ns = no significativo. ND = no determinado.

Sin embargo, las mutaciones en el gen *RASA1* son inusuales. De acuerdo con el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC v78, publicado el 05/09/2016; cancer.sanger.ac.uk), solo 244 de 28.661 tumores analizados (<1%) presentan alguna mutación en *RASA1*. En cáncer de mama la frecuencia es incluso más baja, encontrándose solo 3 mutaciones en 2.141 muestras secuenciadas. Por lo cual, la disminución en los valores de expresión de *RASA1* en un subconjunto de tumores mamarios no se debe probablemente a la presencia de mutaciones en este gen. Dado que el transposón T2/Onc2 no causa mutaciones puntuales sino que produce la disrupción de una copia del gen *Rasa1* (dando lugar a la generación de tumores con niveles bajos pero detectables de la proteína) decidimos analizar el número de copias de *RASA1* en los tumores de mama. Para ello, usamos la base de datos “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA), accesible a través del “*cBioPortal for Cancer Genomics*” (www.cbioportal.org)<sup>47,119</sup>. El análisis del número de copias de *RASA1* en las muestras de cáncer de mama de la cohorte “*Cell 2015*” confirmó que el 26% de los tumores de mama (214 de 816) presentan pérdida de una o ambas copias del gen, siendo mayoritarias las pérdidas hemigóticas (207 de 214). Cuando llevamos a cabo este análisis discerniendo entre los diferentes subtipos de la firma PAM50, observamos que el porcentaje de tumores con pérdida alélica del gen *RASA1* aumentaba hasta el 84% (90 de 107) en los tumores de tipo basal y hasta el 49% (25 de 51) en los tumores de tipo HER2, mientras que la pérdida del gen en los tumores de tipo luminal fue mucho menos frecuente (p<0,0001; **Figura 17**). Además, la pérdida alélica

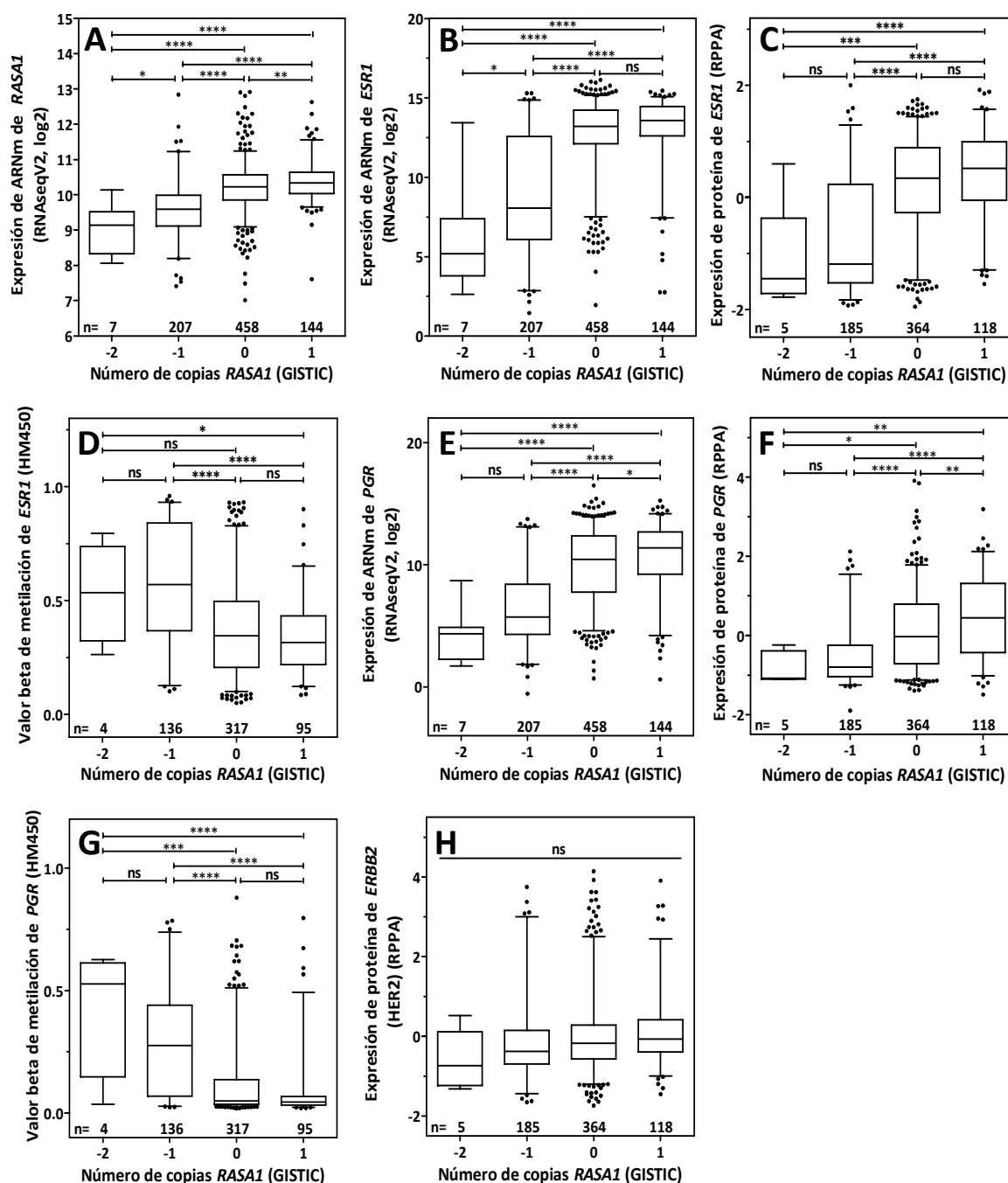


de *RASA1* fue más común en los tumores negativos para el receptor de estrógenos (70%; 122 de 174) que en los positivos (14%; 82 de 594) ( $p < 0,0001$ ; **Figura 17**).



**Figura 17. Análisis de las alteraciones en el número de copias del gen *RASA1* en la cohorte "Cell 2015" (carcinomas ductales invasivos) del TCGA.** Se muestra, para cada subtipo tumoral, el porcentaje de tumores con pérdida o ganancia alélica de *RASA1*, al igual que aquellos tumores diploides (sin cambios) para el gen. Los datos fueron obtenidos desde cBioPortal. Se compararon por separado los subtipos de la firma PAM50 dentro de los carcinomas ductales invasivos (CDI PAM50), los tumores divididos según el estatus del receptor de estrógenos, y los tumores triple negativos y HER2+.

Como cabía esperar, encontramos una clara correlación entre el número de copias y la expresión del ARNm de *RASA1* (**Figura 18A**), confirmando que la pérdida de un alelo es suficiente para disminuir su expresión de forma significativa. Por otro lado, observamos una correlación positiva entre la pérdida de copias de *RASA1* y un descenso en la expresión de *ESR1*, tanto a nivel de ARNm como de proteína (**Figura 18B y 18C**), y también entre el alto grado de metilación de *ESR1* y la delección hemigigótica de *RASA1* (**Figura 18D**), reforzando la asociación entre la pérdida de un alelo de *RASA1* y los tumores negativos para el receptor de estrógenos. También encontramos una correlación similar entre el número de copias de *RASA1* y la expresión y metilación del gen *PGR* (**Figura 18E-18G**), pero no con la expresión de la proteína HER2 (**Figura 18H**).

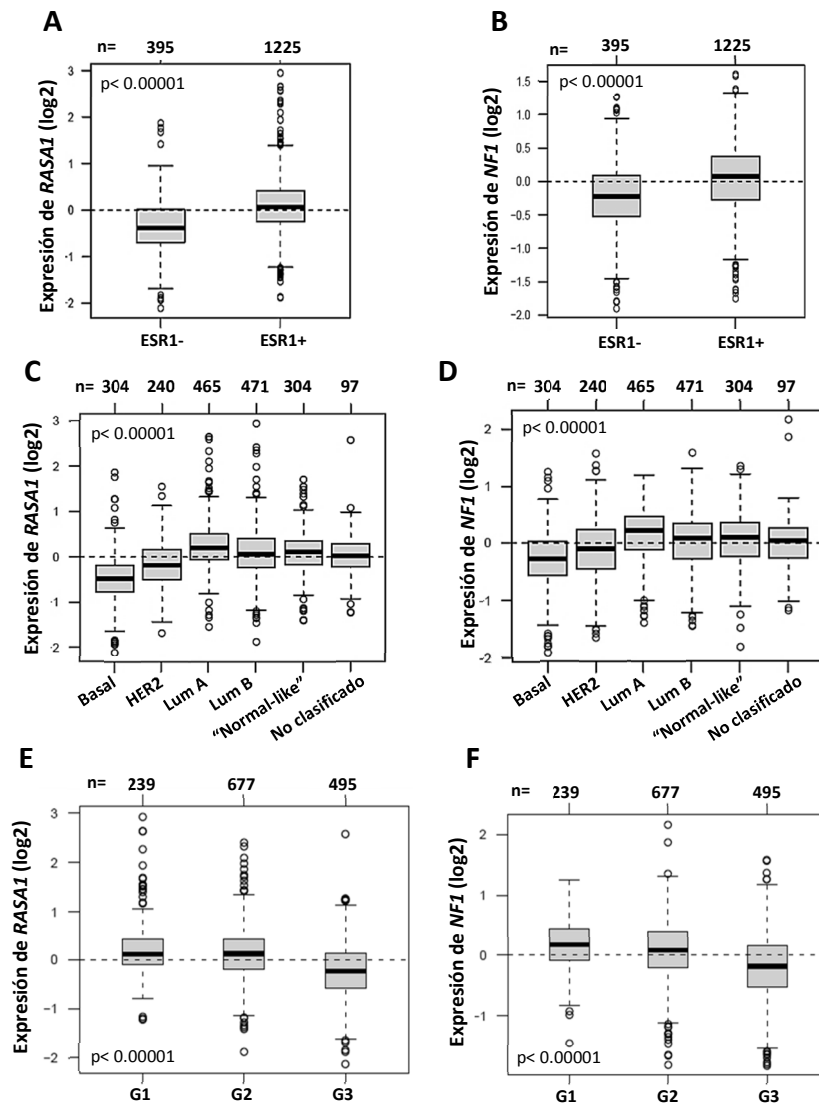


**Figura 18. Análisis de la relación entre el número de copias del gen *RASA1* (GISTIC) en cBioPortal y:** A. los niveles de expresión de ARNm de *RASA1* medidos mediante RNA-seq; B. los niveles de expresión de ARNm de *ESR1*; C. los niveles de expresión proteica de *ESR1*; D. el grado de metilación del gen *ESR1*; E. los niveles de expresión de ARNm de *PGR*; F. los niveles de expresión proteica de *PGR*; G. el grado de metilación del gen *PGR*; H. los niveles de expresión proteica de *HER2*. El número de muestras se indica debajo de cada columna. -2 = delección homocigota; -1 = delección hemocigota; 0 = diploide; 1 = ganancia. Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos muestran la significación estadística (ns = no significativo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

De forma similar a lo observado con el gen *RASA1*, la delección hemocigota del gen *NF1* fue más frecuente en los tumores de subtipo basal (62%, 67 de 107) y *HER2* (59%, 30 de 51) que en el conjunto de todos los tumores mamarios analizados (32%, 261 de 816), siendo estadísticamente significativa su asociación con los tumores de tipo basal de la firma PAM50

( $p < 0,0001$ ) y con los tumores negativos para el receptor de estrógenos ( $p < 0,0001$ ; 98 tumores con delección en *NF1* de 174 negativos para ESR1 (56%), frente a 149 tumores con delección de 594 tumores positivos a ESR1(25%).

Además, llevamos a cabo un meta-análisis de expresión usando la base de datos GOBO (<http://co.bmc.lu.se/gobo>)<sup>121</sup>, la cual abarca más de 1.800 pacientes incluidos en 10 estudios de cáncer de mama. Una vez más, observamos que la expresión de *RASA1* y *NF1* se encontraba significativamente reducida en los tumores de mama negativos para el receptor de estrógenos, y en particular, en los tumores de tipo basal ( $p < 0,0001$ ; **Figura 19A-19D**). Además, la baja expresión de *NF1* y, en mayor medida, de *RASA1* correlacionó con los tumores de alto grado de malignidad histológica (G3;  $p < 0,0001$ ; **Figura 19E y 19F**).

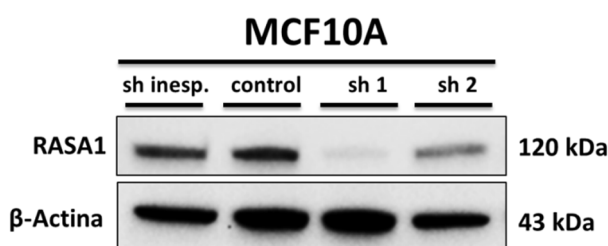


**Figura 19. Meta-análisis de expresión de los genes *RASA1* y *NF1* usando la base de datos GOBO.** Relación entre los niveles de expresión de *RASA1* y *NF1* con: A y B. el estatus de ESR1; C y D. los subtipos moleculares; y E y F. el grado histológico de malignidad. El número de muestras (n) se indica encima de cada columna.

### 2.3 Estudio de la pérdida de *RASA1* en un modelo de célula epitelial mamaria normal.

Para validar estas observaciones *in vitro*, decidimos estudiar el efecto de la reducción de los niveles de expresión de *RASA1* en células epiteliales mamarias humanas. Para ello, empleamos la línea celular MCF10A, que es probablemente la línea más utilizada como modelo de célula epitelial mamaria humana normal. Esta línea celular se obtuvo a partir de un paciente con una enfermedad fibroquística de la glándula mamaria y sufrieron inmortalización espontánea. Las células MCF10A no son tumorigénicas y carecen de características de invasividad. Entre sus características moleculares conocidas se incluyen la delección homocigótica del locus que contiene al gen *CDKN2A*, el cual codifica para las proteínas p16<sup>INK4A</sup> y p14<sup>ARF</sup>, ambas con un papel crítico en los procesos de regulación de la senescencia. Asimismo, se sabe que esta línea celular presenta una pérdida homocigótica del gen *ERBB2* y heterocigótica de los genes *CCND2* e *IGF1R*, así como ganancia genómica de la región 5q13 y amplificación del gen *MYC*. Por otro lado, las células MCF10A no expresan el receptor de estrógenos y no presentan mutaciones en los genes *TP53* y *HRAS*<sup>125,126</sup>.

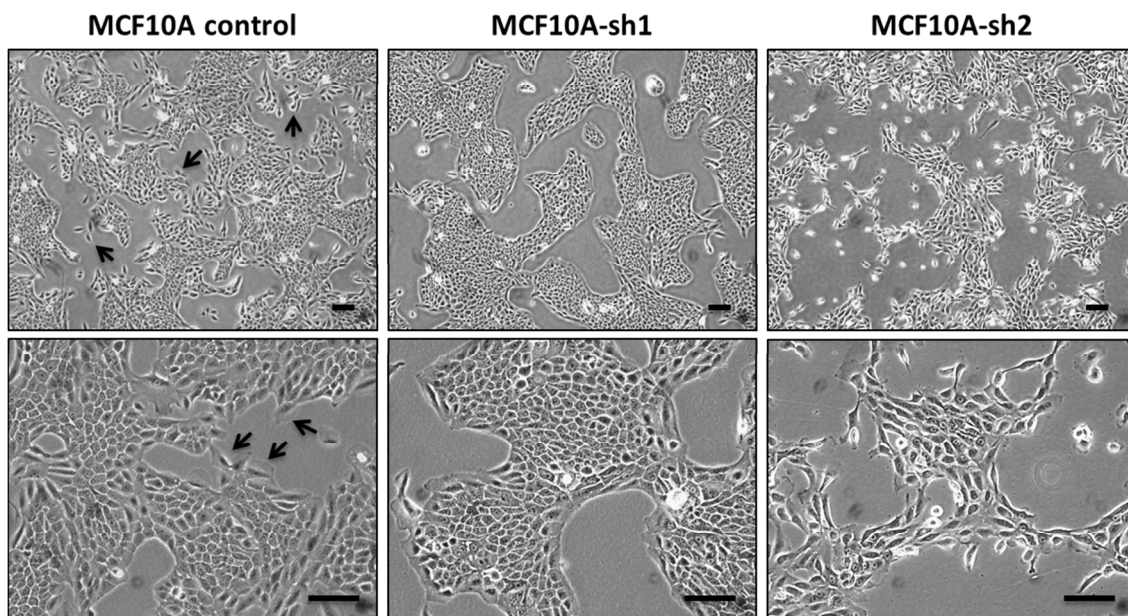
Con el objetivo de reducir permanentemente los niveles de expresión de *RASA1* en las células MCF10A, produjimos lentivirus portadores de dos secuencias interferentes (shARNs) específicas contra *RASA1* que habían sido descritas previamente<sup>110,111</sup>. De este modo, generamos dos líneas estables de MCF10A, a las cuales nos referiremos a partir de ahora como MCF10A-sh1 y MCF10A-sh2. El interferente sh1 dio lugar a una supresión casi completa de la proteína *RASA1*, mientras que el interferente sh2 redujo la expresión proteica alrededor del 50% (Figura 20).



**Figura 20.** Western blot mostrando los niveles de expresión de *RASA1* tras la expresión de dos shARNs específicos. sh inesp. = shARN inespecífico.

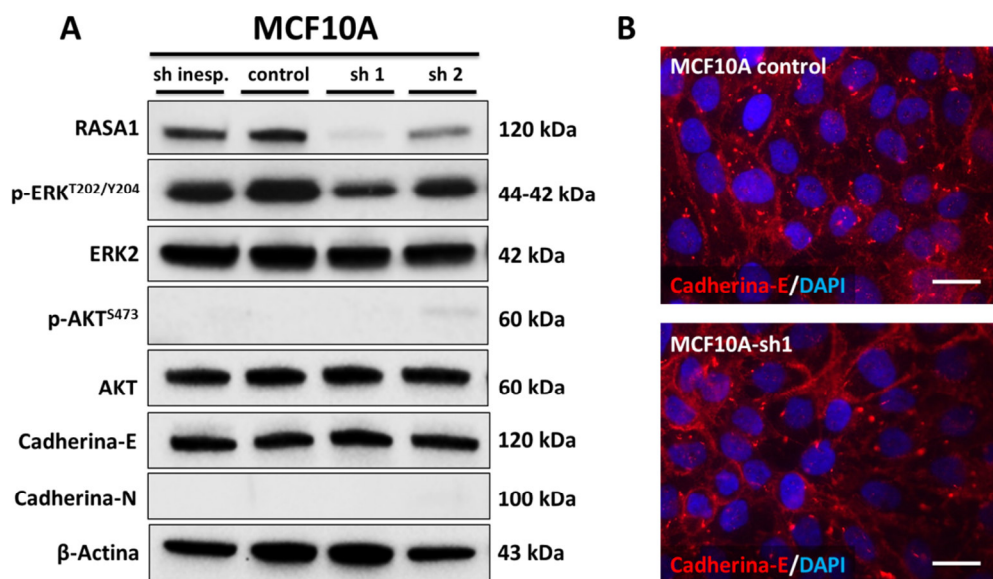
El fenotipo de las células MCF10A varía según su estado de confluencia. En condiciones de alta densidad celular forman grupos en cuyo interior las células adquieren una morfología epitelial compacta, mientras que las células marginales presentan una morfología más fibroblastoide con una elevada motilidad. Por otro lado, cuando las células se siembran a baja

confluencia, un mayor porcentaje de la población exhibe una morfología fusiforme<sup>127</sup>. Las células MCF10A-sh2 no mostraron alteraciones fenotípicas evidentes, sin embargo, las células MCF10A-sh1 adquirieron leves cambios fenotípicos (pero consistentes y mantenidos en el tiempo), formando grupos celulares más compactos y empaquetados, estando casi ausentes las células marginales de fenotipo migratorio (**Figura 21**).



**Figura 21. Morfología de las células MCF10A tras la disminución de la expresión de RASA1.** Las células MCF10A-sh1 forman grupos más compactos y disminuye el número de células marginales migratorias. Las flechas señalan algunas células marginales migratorias en las MCF10A control. Las barras representan 100  $\mu$ m.

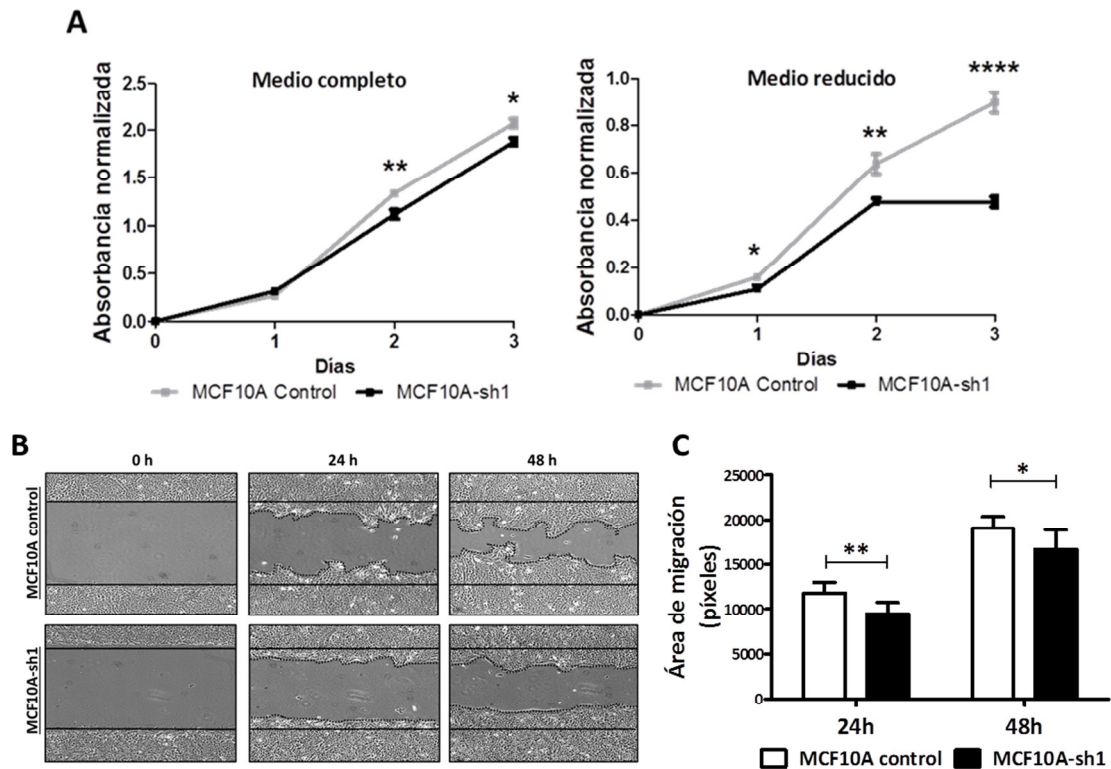
Con el fin de evaluar si la disminución de la expresión de RASA1 daba lugar a la activación de la vía de Ras como consecuencia de la pérdida de su función Ras-GAP, estudiamos la activación de dos de los principales efectores de esta vía, ERK y AKT, mediante western blot. No observamos alteraciones en la activación de estas proteínas con ninguno de los dos interferentes (**Figura 22A**), sugiriendo que la pérdida de la función Ras-GAP de RASA1 por sí sola no es suficiente para activar la vía de Ras en esta línea celular. Por otro lado, tampoco observamos diferencias en los niveles de expresión y la localización de la cadherina-E y ninguna de ellas expresó la cadherina-N (**Figura 22A-22B**).



**Figura 22. La disminución de RASA1 en las células MCF10A no activa la vía de Ras ni modifica la expresión de cadherinas.** A. Western blot mostrando la fosforilación de ERK y AKT tras la pérdida de RASA1, así como los niveles de cadherina-E y cadherina-N. B. Inmunofluorescencias mostrando el patrón de expresión de cadherina-E en células control y en células MCF10A-sh1. sh inesp. = shARN inespecífico. Las barras representan 20  $\mu$ m.

Dado que la casi completa inhibición de RASA1 llevada a cabo por el interferente sh1 dio lugar a un cambio fenotípico, decidimos realizar algunas pruebas funcionales con esta línea celular. El análisis de la proliferación celular mediante ensayos colorimétricos determinó que las células MCF10A-sh1 presentan una menor tasa de proliferación que las células MCF10A control y que, además, este efecto se exagera cuando las células se cultivan en un medio con bajo porcentaje de suero y sin EGF (**Figura 23A**). Además, estudiamos la migración celular usando un ensayo clásico de cicatrización de heridas *in vitro*. Las células MCF10A-sh1 presentaron una menor capacidad de migración que las células control a las 24 y 48 horas después de la realización de la herida ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente; **Figura 23B-23C**).



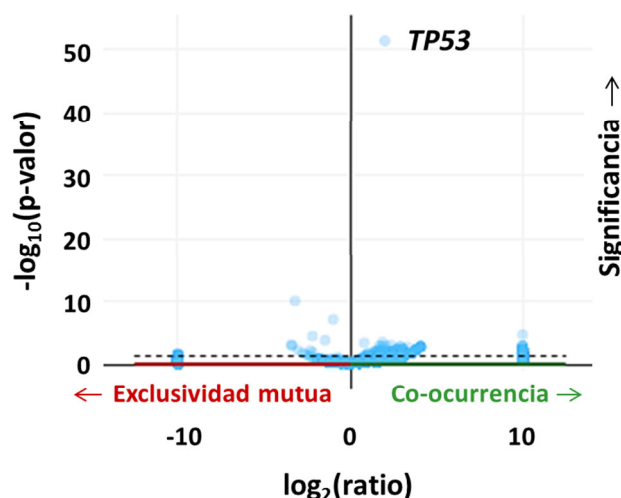


**Figura 23.** La pérdida casi completa de la proteína RASA1 en las células MCF10A disminuye su proliferación y su capacidad de migración. A. Curvas de crecimiento representativas de las células MCF10A control y las MCF10A-sh1 en un medio completo y en un medio reducido (con bajo porcentaje de suero y sin EGF). La proliferación fue medida con un ensayo de proliferación colorimétrico usando XTT. Los datos representan la media de la absorbancia normalizada  $\pm$  el error estándar. B. Imagen representativa de un ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*, a las 0, 24 y 48 horas después de realizar la herida. C. Cuantificación del área de migración a las 24 y 48 horas después de realizar la herida. En cada experimento se realizaron 6 heridas para cada tipo celular. El área de migración se midió con el programa ImageJ. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos muestran la significación estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 2.4 Colaboración de la pérdida de RASA1 y las mutaciones en TP53 en los tumores de mama triple negativos.

Del apartado anterior concluimos que la reducción de los niveles de expresión de RASA1 por sí sola no parece ser un evento transformante en las células MCF10A, las cuales exhiben una menor proliferación y migración cuando la pérdida proteica de RASA1 es casi completa. Sin embargo, la pérdida de al menos un alelo del gen *RASA1* (y su consecuente disminución en la expresión) es un evento frecuente en los tumores de mama humanos, especialmente en aquellos negativos para el receptor de estrógenos o de tipo basal. Por ello, decidimos estudiar la posible asociación existente entre esta pérdida y otras alteraciones comunes en estos tumores. Cuando analizamos la concomitancia de la pérdida del gen *RASA1* con otras alteraciones génicas (mutaciones, alteración en el número de copias, etc.) en la cohorte de tumores mamarios “Cell 2015” de la base de datos “The Cancer Genome Atlas” (TCGA),

observamos una asociación muy fuerte con la presencia de mutaciones en el gen *TP53* ( $p < 4E-52$ ; Figura 24).



**Figura 24.** Representación gráfica de la exclusividad mutua o la co-ocurrencia de la pérdida de *RASA1* con la mutación de otros genes en los tumores de mama. El ratio se calcula dividiendo el porcentaje de tumores en el grupo alterado entre el porcentaje en el grupo no alterado; considerándose el grupo alterado aquellos tumores de mama con pérdida de *RASA1*. La significancia se representa como el  $-\log_{10}$  del p-valor. Se muestra la localización del evento de mutación en el gen *TP53*.

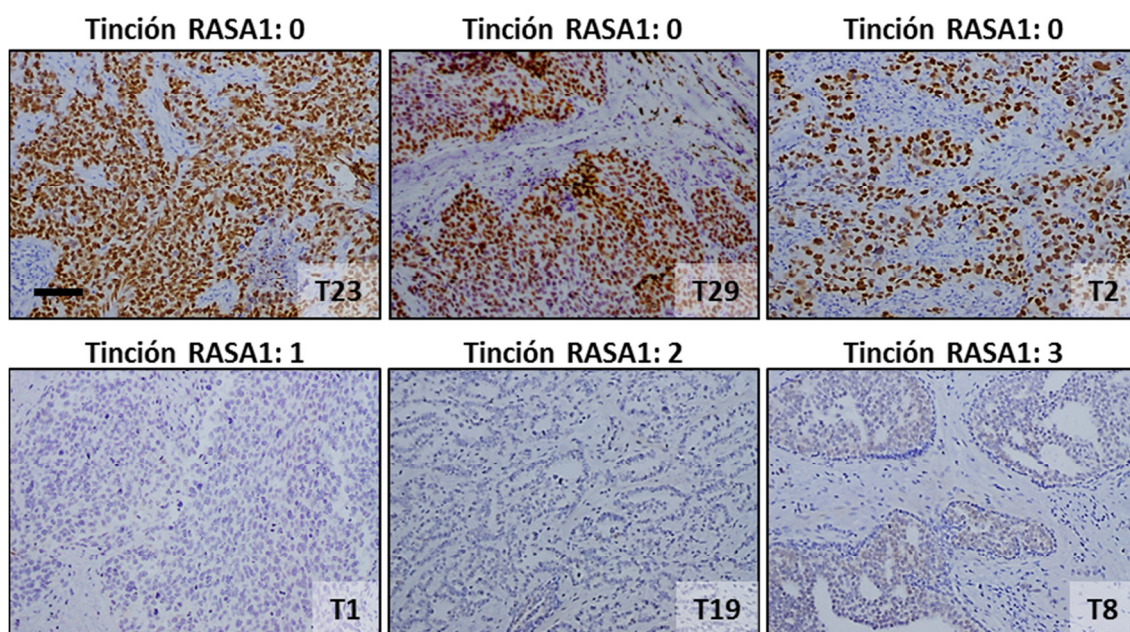
El 20% (165 de 816) de los tumores analizados en esta base de datos presentaban de forma concomitante la pérdida alélica de *RASA1* y mutaciones en *TP53*. Sin embargo, este porcentaje aumentó hasta el 75% (79 de 107) cuando analizamos los tumores de tipo basal de la firma PAM50 ( $p < 0,0001$ ; test exacto de Fisher; **Tabla 9**). De igual modo, este porcentaje aumentaba de un 8% (46 de 594) en los tumores positivos para el receptor de estrógenos, a un 64% (111 de 174) en aquellos negativos para este receptor ( $p < 0,0001$ ; test exacto de Fisher; **Tabla 9**).

	Tipo tumoral	Pérdida de <i>RASA1</i>	Mutación en <i>TP53</i>	Pérdida de <i>RASA1</i> y mutación en <i>TP53</i>
Firma PAM50 (n=481)	Tipo basal (n=107)	90 (84%)	92 (86%)	79 (75%)
	HER2 (n=51)	25 (49%)	37 (73%)	22 (43%)
	Luminal A (n=201)	15 (7%)	28 (14%)	7 (3%)
	Luminal B (n=122)	34 (28%)	52 (43%)	22 (18%)
Estatus ESR1 (n=768)	ESR1+ (n=594)	82 (14%)	125 (21%)	46 (8%)
	ESR1- (n=174)	122 (70%)	142 (82%)	111 (64%)
Otros	Triple Negativo (n=82)	63 (77%)	66 (80%)	55 (67%)
	HER2+ (n=120)	35 (29%)	56 (47%)	28 (23%)
	Todos los tumores (n=816)	214 (26%)	280 (34%)	165 (20%)

**Tabla 9.** Porcentajes de los tumores con pérdida de *RASA1*, mutación en *TP53* o ambos eventos de forma concomitante dentro de cada subtipo tumoral. Aquellos eventos que ocurren en más del 60% de los tumores se muestran en negrita y con el fondo en gris.



A la vista de estos resultados, decidimos llevar a cabo una tinción inmunohistoquímica de p53 en nuestra colección de tumores de mama humanos. El 25% de los tumores (8 de 32) mostraron una tinción intensa y generalizada por todo el tumor, compatible con la presencia de una mutación con cambio de sentido o “*missense*” en el gen *TP53*. Observamos una asociación entre la tinción positiva de p53 y la tinción nula o leve para *RASA1* (6 de 8), siendo estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ; test chi-cuadrado; **Figura 25 y Anexo I**).



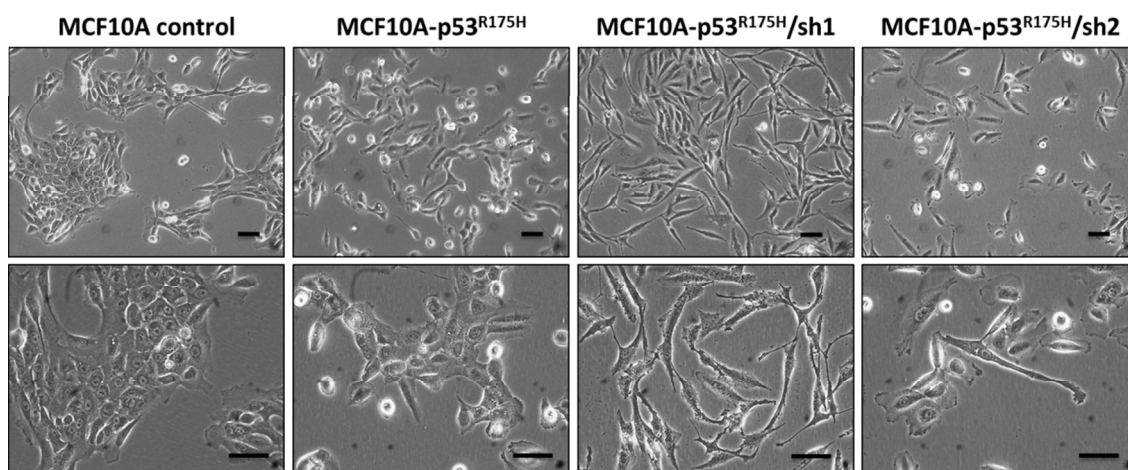
**Figura 25. Tinciones inmunohistoquímicas de tumores de mama humanos usando un anticuerpo contra p53.** Imágenes representativas de tinciones positivas (fila superior) y negativas (fila inferior) en varios tumores de mama. Encima de cada imagen se muestra el nivel de tinción de *RASA1* para estos tumores. El número del tumor se indica en la esquina inferior derecha y corresponde con los tumores mostrados en la figura 13. La barra representa 100µm.

Con el objetivo de validar la colaboración entre la pérdida de *RASA1* y las mutaciones en el gen *TP53*, decidimos combinar ambos eventos en las células mamarias MCF10A. Dado que en los tumores de mama humanos existe una gran diversidad de mutaciones “*missense*” y “*nonsense*” en el gen *TP53*, optamos por emplear la mutación más frecuente de este gen en todos los tipos de cáncer en general, y en el cáncer de mama en particular: la mutación “*missense*” R175H<sup>128</sup>. Para ello, expresamos el *TP53* mutante en las células MCF10A control y en las dos líneas que portan los interferentes para *RASA1* mediante infección de las células con un vector retroviral.

#### 2.4.1 Activación del proceso de EMT e incremento de la capacidad de invasión mediada por la pérdida de *RASA1* y la mutación de *TP53*.

Como ya hemos descrito, las células MCF10A en la cuales se inhibe parcialmente la expresión de *RASA1* no presentan un fenotipo de malignidad. Por otro lado, cuando

expresamos el mutante dominante negativo de p53, las células MCF10A experimentan un ligero cambio fenotípico, adquiriendo una morfología más mesenquimal. Sin embargo, cuando combinamos la inactivación de RASA1 con la expresión de la proteína p53 mutante, este cambio fenotípico fue mucho más severo (especialmente en la línea MCF10A-sh1, con mayor inhibición en la expresión de RASA1), perdiendo las células su morfología cuboidal, adquiriendo un aspecto fusiforme y disminuyendo su capacidad de adhesión al sustrato (que se manifiesta en la necesidad de tiempos mucho más cortos para su tripsinización) (**Figura 26**).



**Figura 26. Morfología de las células MCF10A cuando se combina la pérdida de RASA1 con la mutación R175H de TP53.** Las células dobles ( $p53^{R175H}$ -shRASA1) muestran un fenotipo fusiforme, especialmente las del sh1. Las barras representan 50  $\mu$ m.

Los cambios morfológicos experimentados por las células MCF10A- $p53^{R175H}$ -shRASA1 sugieren la posible activación del mecanismo de EMT. Con el fin de estudiar este proceso más detalladamente, llevamos a cabo una caracterización del fenotipo epitelial y/o mesenquimal de estas células. Para ello, realizamos ensayos de citometría de flujo empleando anticuerpos específicos contra dos marcadores de superficie: EpCAM (molécula de adhesión de las células epiteliales) y CD49f (también conocida como integrina  $\alpha 6$ ). Las células MCF10A presentan dos subpoblaciones diferentes cuando se analizan estos marcadores de superficie: la subpoblación  $EpCAM^+/CD49f^{hi}$ , la cual muestra un fenotipo epitelial, y la subpoblación  $EpCAM^-/CD49^{med/low}$ , que presenta un fenotipo mesenquimal. La proporción de ambas subpoblaciones puede oscilar dependiendo del estado de confluencia de las células en el momento del análisis, observándose un incremento de la subpoblación epitelial en estados de alta confluencia<sup>21,129</sup>. Cuando se analizaron estos marcadores en las células MCF10A control a una confluencia aproximada del 90%, se observó una subpoblación epitelial mayoritaria (~95%). Lo mismo ocurrió cuando se analizaron ambas líneas shRasa1 a dicha confluencia. Sin embargo, las células MCF10A- $p53^{R175H}$  presentaban una reducción de la población epitelial y un aumento de

la mesenquimal (75% y 25%, respectivamente). Este efecto fue más acusado si en las células están presentes simultáneamente los shARNs de *RASA1* y la mutación en *TP53*. En el caso del interferente sh1, casi todas las células fueron  $\text{EpCAM}^-/\text{CD49}^{\text{med/low}}$ , mientras que en el interferente sh2 observamos aproximadamente un 40% de células  $\text{EpCAM}^+/\text{CD49}^{\text{hi}}$  y un 60% de células  $\text{EpCAM}^-/\text{CD49}^{\text{med/low}}$ , confirmando el cambio fenotípico de ambas líneas celulares y las diferencias existentes dependiendo de los niveles de expresión de *RASA1* (Figura 27).

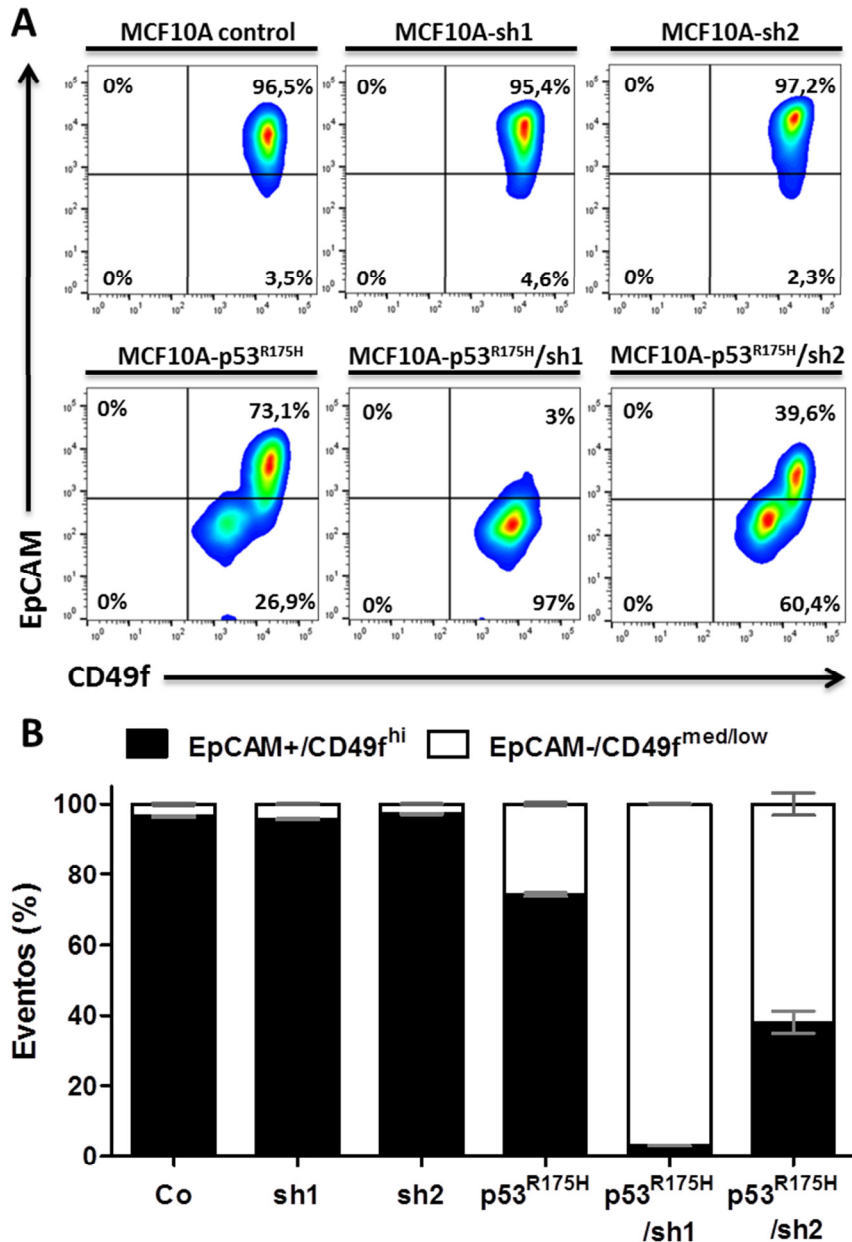
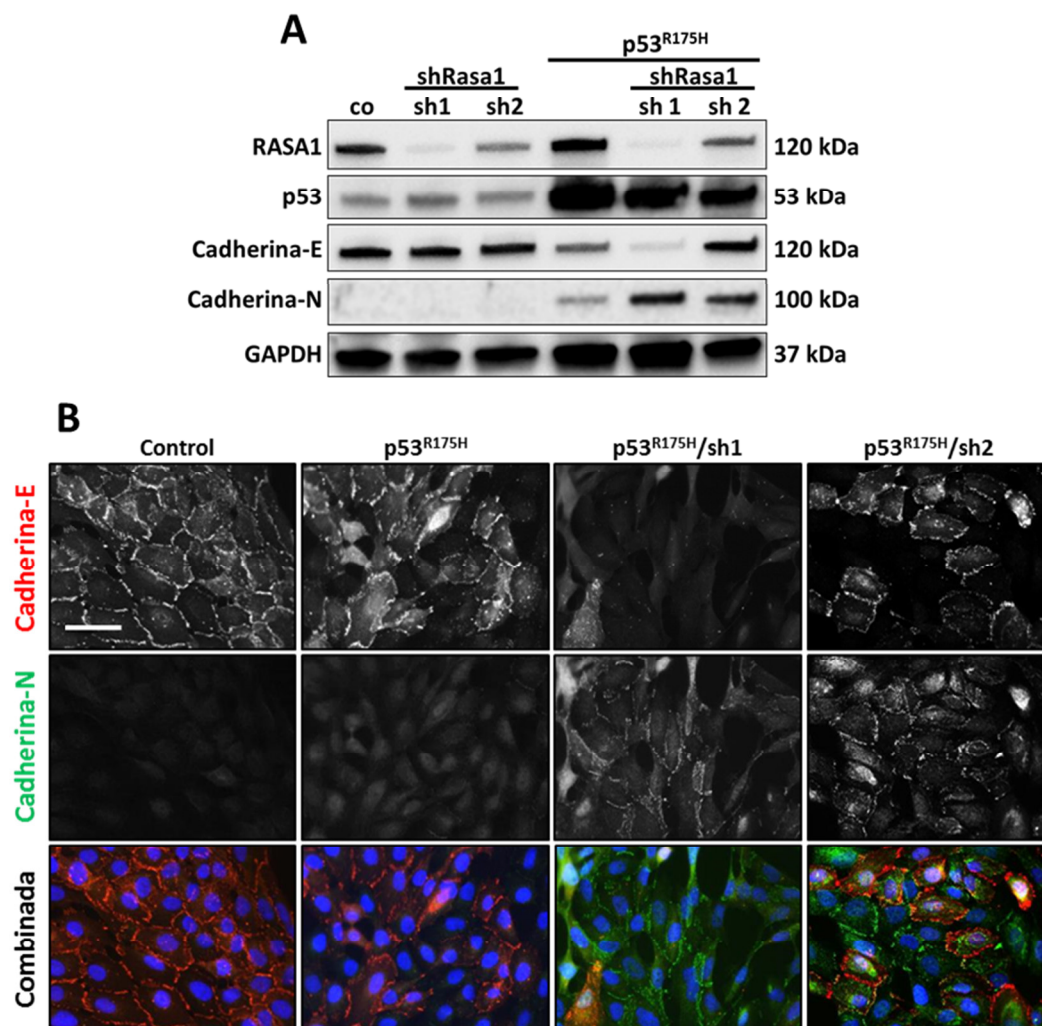


Figura 27. La pérdida de *RASA1* junto con la mutación R175H de *TP53* da lugar a un fenotipo mesenquimal en las células MCF10A. A. Gráfica representativa del análisis por citometría de flujo de los marcadores EpCAM y CD49f (integrina  $\alpha 6$ ) para cada tipo celular. B. Cuantificación de los datos mostrados en la figura 26A. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar.

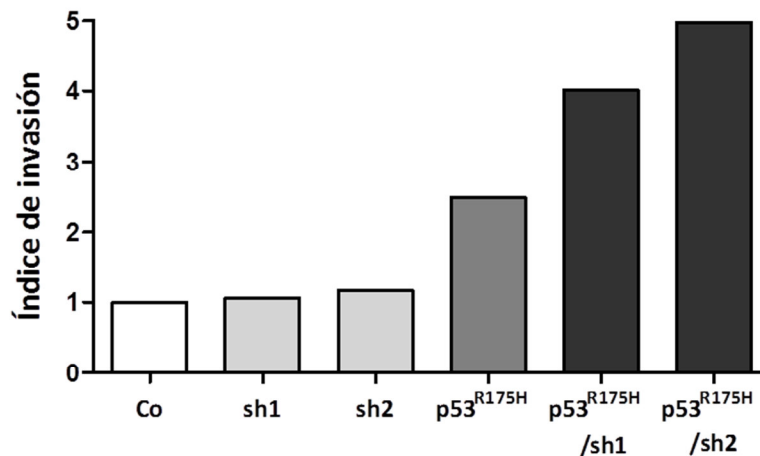


Con el fin de caracterizar en mayor profundidad el proceso de EMT que acontece en estas células, analizamos los niveles de expresión de la cadherina-E y la cadherina-N mediante western blot (**Figura 28A**), así como su patrón de expresión mediante inmunofluorescencia (**Figura 28B**). Las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup> mostraron una ligera disminución en los niveles de expresión de la cadherina-E mediante ambas técnicas, observándose un leve aumento en la expresión de la cadherina-N mediante western blot. Con respecto a las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-shRASA1, observamos que en ambos casos tuvo lugar un incremento de la cadherina-N, siendo superior al acontecido en las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>. Las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-sh1 mostraron una marcada disminución de la cadherina-E tanto por western blot como por inmunofluorescencia. Sin embargo, a pesar de no observar dicha disminución por western blot en las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-sh2, encontramos una reducción parcial y una deslocalización de la proteína mediante inmunofluorescencia, exhibiendo un patrón discontinuo de tinción, en lugar de la tinción continua de las células control (**Figura 28**).



**Figura 28.** Alteraciones en las cadherinas-E y -N en las células MCF10A por la combinación de la pérdida de RASA1 y la mutación en *TP53*. A. Western blot y B. inmunofluorescencias mostrando la expresión de las cadherinas-E y -N cuando se disminuyen los niveles de expresión de RASA1 y se expresa p53<sup>R175H</sup>. La barra representa 100  $\mu$ m.

Dado que el proceso de EMT ha sido relacionado con la adquisición de una mayor capacidad migratoria e invasiva asociada al desarrollo de metástasis<sup>49,130</sup>, llevamos a cabo un estudio de invasión *in vitro* usando cámaras de Boyden. Las MCF10A-sh1 y sh2 no mostraron diferencias con respecto a las células control, mientras que las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup> mostraron un mayor índice de invasión. Cuando analizamos ambas líneas MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-shRasa1, observamos un incremento aún mayor del índice de invasión, indicando que la combinación de ambos eventos conduce a una mayor capacidad migratoria e invasiva (**Figura 29**).

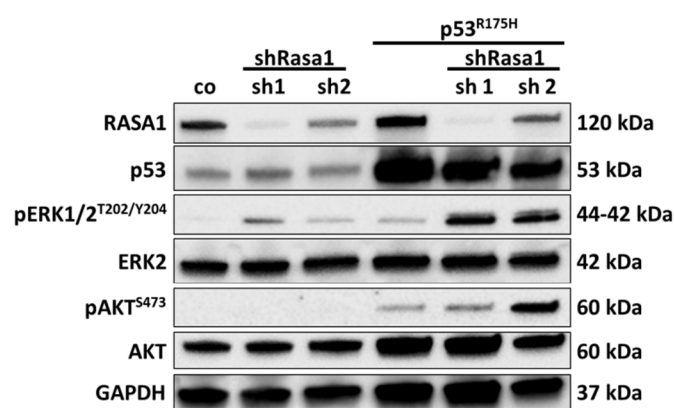


**Figura 29.** Las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-shRasa1 presentan una mayor capacidad invasiva que las células control. La gráfica muestra los índices de invasión con respecto a las células control calculados mediante un ensayo de invasión sobre matrigel *in vitro*.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la combinación de la pérdida de *RASA1* y la presencia de p53<sup>R175H</sup> da lugar a la adquisición de un fenotipo más agresivo, con inducción del proceso de EMT y un incremento en la capacidad de invasión en células MCF10A. Curiosamente, los dos interferentes de *RASA1* ejercen efectos similares pero no idénticos en las células MCF10A en un contexto p53 mutante. La casi total inactivación de *RASA1* mediada por el interferente sh1 da lugar a una pérdida casi completa de EpCAM y de la cadherina-E, mientras que la inactivación parcial de *RASA1* por el interferente sh2 resulta en una pérdida parcial de ambas proteínas. Sin embargo, en ambos casos las células experimentan una inducción semejante de la expresión de la cadherina-N y presentan un índice de invasión similar, lo que indica que la pérdida de *RASA1*, aunque no sea completa, da lugar a un aumento de la malignidad de las células mamarias humanas cuando coexiste con mutaciones en el gen *TP53*.

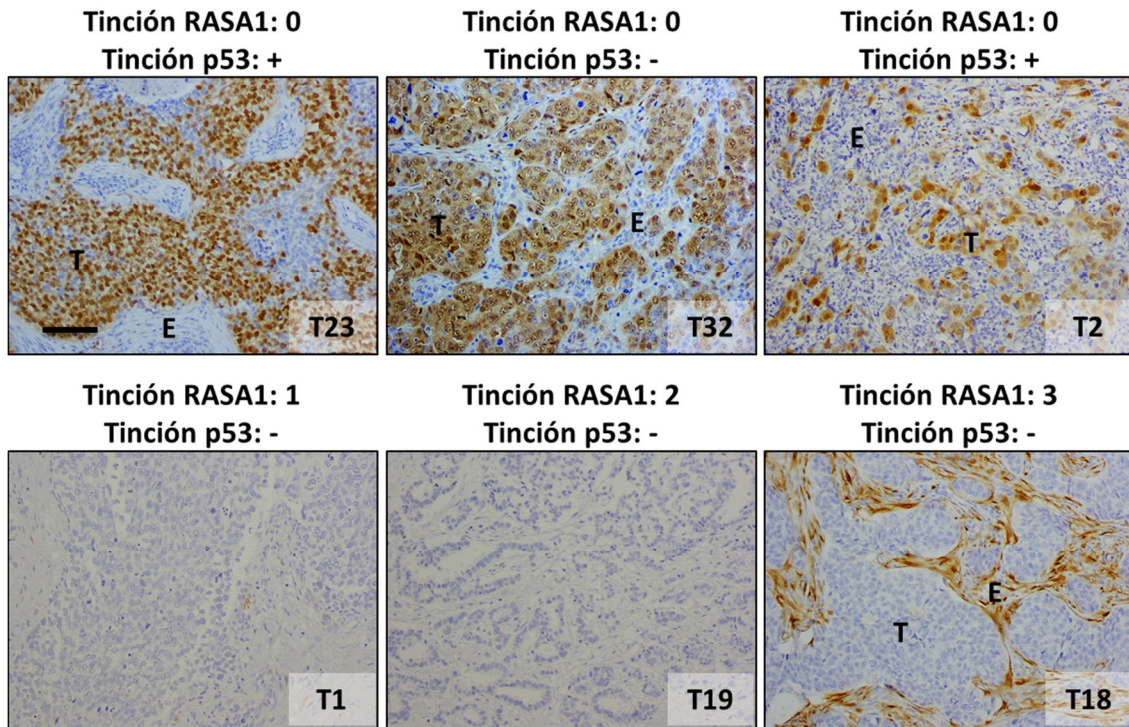
### 2.4.2 -La reducción en la expresión de *RASA1* junto con la mutación R175H del gen *TP53* induce la activación de la vía de señalización de Ras.

Para evaluar si la pérdida de *RASA1* junto con la mutación R175H del gen *TP53* activa la vía de señalización de Ras, estudiamos dos de los principales efectores de esta vía, ERK y AKT, mediante western blot. Observamos que las dos líneas celulares MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-shRASA1 experimentan una clara activación de la vía de señalización de Ras, evidenciada por un aumento en los niveles de fosforilación de ERK y AKT (**Figura 30**).



**Figura 30.** Las células MCF10A-p53<sup>R175H</sup>-shRasa1 muestran una mayor activación de la vía de señalización de Ras. Western blot en el que se muestran los niveles de fosforilación de ERK y AKT en las células MCF10-p53<sup>R175H</sup>-shRasa1 con respecto a sus respectivos controles.

Por otro lado, analizamos la activación de ERK en nuestra colección de tumores mamarios y observamos que 6 de ellos (19%) mostraron una tinción intensa y generalizada por todo el tejido tumoral, indicando la activación de esta vía en estos tumores. De estos 6 tumores, 5 presentaban niveles nulos o leves de expresión de *RASA1* y, además, eran negativos para el receptor de estrógenos. Asimismo, 3 de estos 5 tumores mostraban una tinción generalizada de p53 (**Figura 31 y Anexo I**). A pesar de que el número de tumores con activación de ERK fue reducido, estos datos sugieren una tendencia hacia la activación de la vía de Ras en los tumores con pérdida de *RASA1* y su posible asociación con mutaciones en el gen *TP53*.



**Figura 31.** Tinciones inmunohistoquímicas de tumores de mama humanos usando un anticuerpo contra p-ERK1/2 (T202/Y204). Imágenes representativas de tinciones positivas (fila superior) y negativas (fila inferior) en varios tumores de mama. Encima de cada imagen se indica el nivel de tinción de RASA1 para estos tumores, así como si son positivos o negativos para la tinción de p53 (ver figura 25). El número del tumor se indica en la esquina inferior derecha. T = tumor; E = estroma. La barra representa 100µm.

### 3. Implicación de ERAS en el cáncer de mama.

#### 3.1 Análisis de la expresión de ERAS en los tumores de mama generados en los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-.

De los 37 tumores mamarios obtenidos a partir del modelo de ratón con transposición en células que expresan la queratina K5, dos tumores de los ratones SB/T2 y uno SB/T2/p53+/- mostraron inserción del transposón en el gen *Eras*. Todas las inserciones se localizaron en el único intrón de este gen, que corresponde a la región 5' de la secuencia codificante. Además, en todos los casos el transposón insertado presentaba la misma orientación que el gen, indicando una posible activación transcripcional de *Eras* como resultado de su integración (**Figura 32**). Esto sugiere que la activación de *Eras* puede ser un evento importante en el desarrollo de estos tumores de mama.

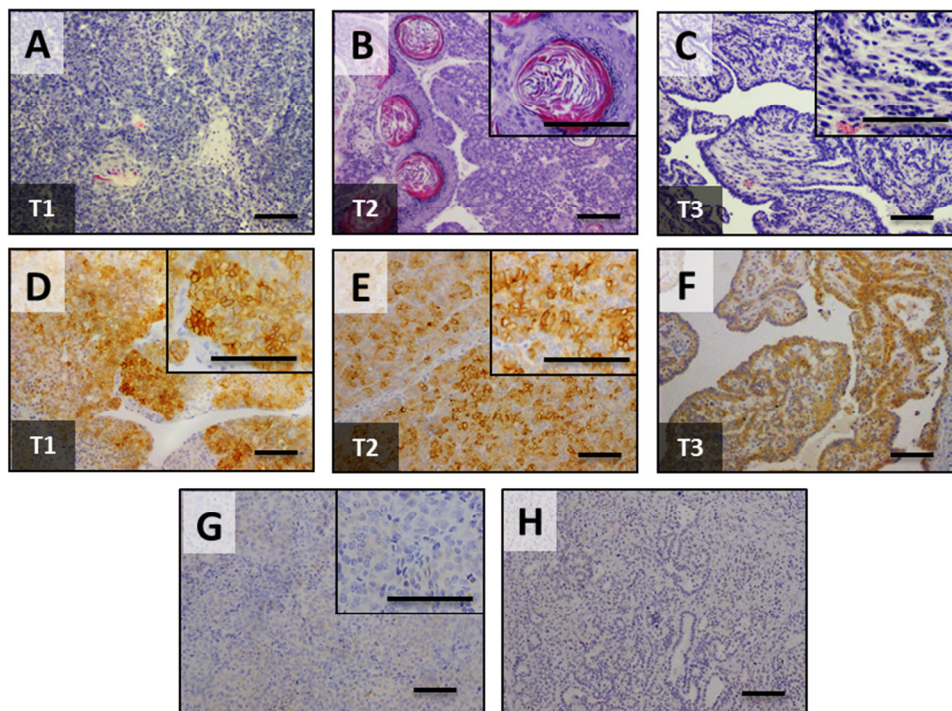
#### *Eras*. Cromosoma X



**Figura 32.** Estructura del gen *Eras* en ratones. Se muestra la localización y orientación de los transposones integrados en el primer intrón del gen *Eras* (triángulos verdes).



El análisis histológico de estos tumores mostró que los dos tumores originados en los ratones SB/T2 con inserción en *Eras* eran un carcinoma adenoescamoso y un carcinoma túbulo-papilar, mientras que el tumor originado en el ratón SB/T2/p53+/- era un carcinoma alveolar-papilar (**Figuras 33A-33C**). El análisis inmunohistoquímico confirmó la expresión de ERAS en estos tumores, mientras que ninguno de los tumores sin inserción en *Eras* que fueron analizados mostró niveles detectables de expresión (**Figuras 33D-33H**). Dado que parece que *Eras* actúa como un gen “driver” en estos tumores, decidimos estudiar el efecto de la expresión de ERAS en células de glándula mamaria humanas y su relación con el cáncer de mama.



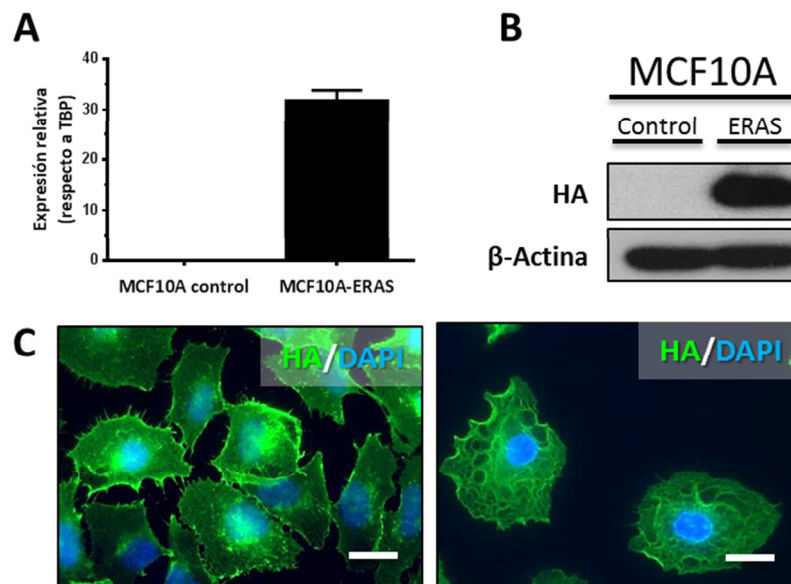
**Figura 33.** La inserción del transposón en 5' del gen *Eras* induce su expresión en los tumores de glándula mamaria de los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/- . Las imágenes A, B y C son tinciones de hematoxilina-eosina de los tumores mamarios con inserción del transposón en el gen *Eras*, las cuales corresponden a un carcinoma alveolar-papilar, a un carcinoma adenoescamoso y a un carcinoma tubular-papilar (con abundante componente mioepitelial), respectivamente. En la esquina superior derecha de las imágenes B y C podemos observar con un mayor detalle la formación de perlas de queratina y el componente mioepitelial, respectivamente. Las imágenes D, E y F muestran la expresión de ERAS mediante inmunohistoquímica en estos tumores. Las imágenes G y H son ejemplos representativos de tinciones inmunohistoquímicas para ERAS de tumores sin inserción de transposones en este locus, los cuales no expresan ERAS. Los recuadros superiores muestran imágenes a mayores aumentos donde se observa que la tinción de ERAS está asociada a la membrana plasmática en las figuras E y D, y una tinción negativa en la figura G. Las barras indican una medida de 100  $\mu$ m. Los tumores son identificados como T1, T2 y T3 en la esquina inferior izquierda.



### 3.2 Estudio de la función de *ERAS* en un modelo de célula epitelial mamaria humana normal.

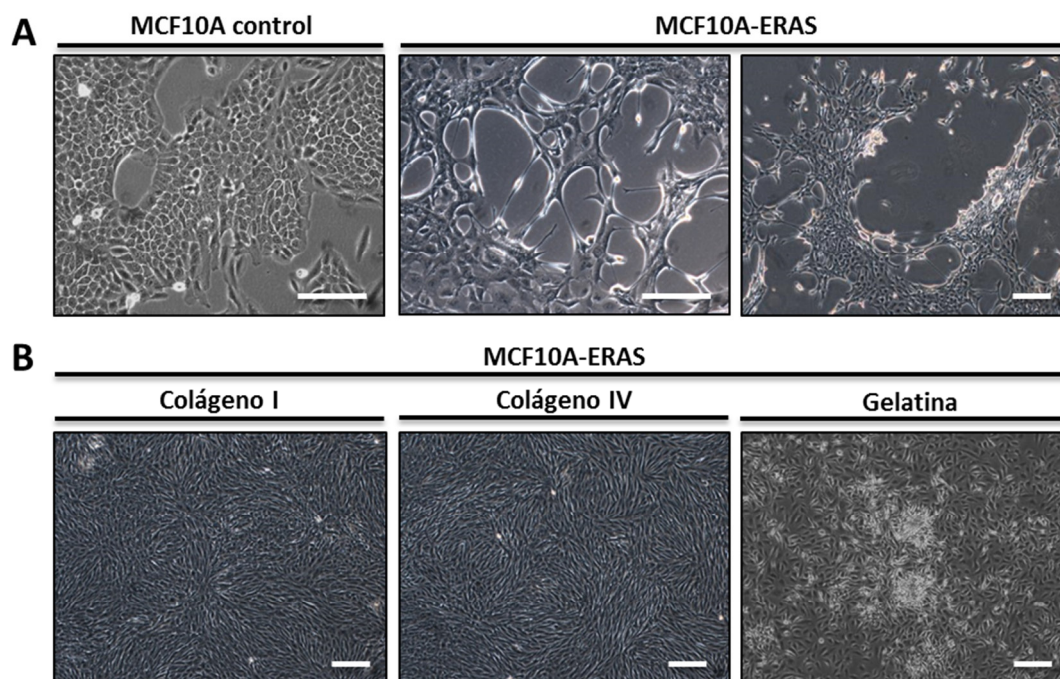
#### 3.2.1 -Estudio de la expresión de *ERAS* en las células MCF10A y sus cambios morfológicos.

Clonamos el gen humano *ERAS* (con el epítipo HA en su extremo 5') bajo el control del promotor CAG (un promotor sintético derivado de la beta-actina, utilizado con frecuencia para inducir la expresión de genes en mamíferos<sup>113</sup>) y forzamos su expresión en las células MCF10A (en adelante, células MCF10A-ERAS). La expresión del transgén se confirmó mediante RT-PCR cuantitativa y western blot (Figuras 34A y 34B). Para determinar la localización intracelular de *ERAS* en las células MCF10A llevamos a cabo inmunofluorescencias usando un anticuerpo contra el epítipo HA. Al igual que otros miembros de la familia Ras, *ERAS* contiene un motivo CAAX que es esencial para su localización en la membrana celular y, por lo tanto, para su función<sup>104,131</sup>. Como se esperaba, *ERAS* se localizó principalmente en la membrana plasmática, pero también en el citosol y otros orgánulos membranosos (Figura 34C).



**Figura 34. Expresión y localización de *ERAS* en las células MCF10A.** La figura A muestra los niveles de expresión de ARNm del transgén respecto a las células control. Los valores de expresión relativa representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes y se normalizaron con la expresión del gen *TBP*. La figura B muestra la expresión de *ERAS* mediante western blot, observándose una proteína de 24 kDa fusionada al epítipo HA. En la figura C se puede observar la localización de *ERAS* dentro de las células MCF10A mediante inmunofluorescencias, principalmente en la membrana plasmática. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. Las barras representan 20  $\mu$ m.

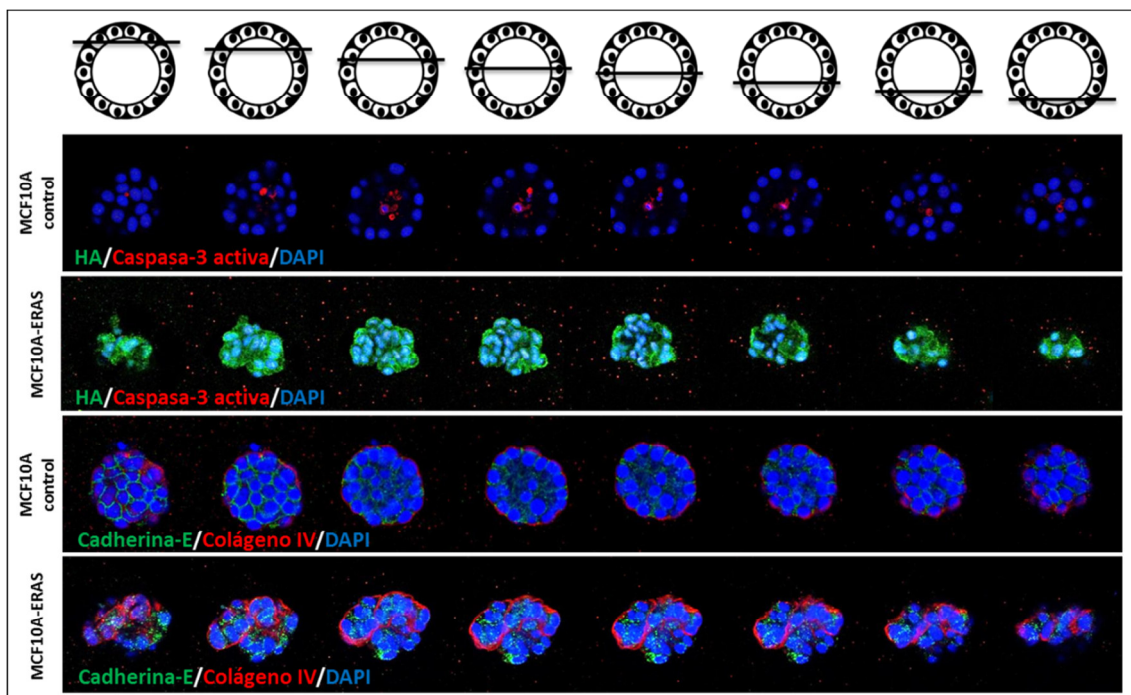
Por otro lado, la expresión de ERAS indujo un marcado cambio fenotípico en las células MCF10A, induciendo el cambio a una morfología fusiforme con abundantes prolongaciones citoplasmáticas (**Figura 35A**). Además, estas células experimentaron una pérdida de adhesión célula-célula y con el sustrato. Con el objetivo de mejorar su adhesión a las placas de cultivos celulares y facilitar su mantenimiento *in vitro*, tratamos las placas con colágeno I, colágeno IV o gelatina. En todos los casos hubo una mejora significativa de la adhesión al sustrato, por lo que se decidió tratar las placas con gelatina a partir de este momento. (**Figura 35B**).



**Figura 35. ERAS induce cambios morfológicos en las células MCF10A.** A. Las células MCF10A-ERAS presentan numerosas prolongaciones y pierden la adhesión al sustrato y entre células. B. Empleo de diferentes sustratos para mejorar la adhesión de las células MCF10A-ERAS. Las barras representan 200  $\mu\text{m}$ .

Con el propósito de investigar el efecto de la sobreexpresión de ERAS en la morfogénesis acinar, llevamos a cabo cultivos en tres dimensiones. Cuando las células MCF10A se siembran a baja densidad sobre una superficie de matrigel son capaces de formar estructuras esféricas similares a acinos. Estas estructuras se denominan mamóferas y recapitulan numerosas características de la arquitectura glandular *in vivo*, incluyendo la síntesis de una membrana basal conteniendo marcadores como el colágeno IV o la laminina V, y la formación de un lumen hueco rodeado por células epiteliales polarizadas. La formación del lumen está asociada con la apoptosis de las células localizadas en el centro del acino, lo cual ocurre cuando éstas pierden el contacto con la membrana basal<sup>109,132</sup>. A diferencia de las células control, las células MCF10A-ERAS formaron estructuras aberrantes e irregulares, perdiendo la morfología esférica y careciendo de lumen (**Figura 36**).

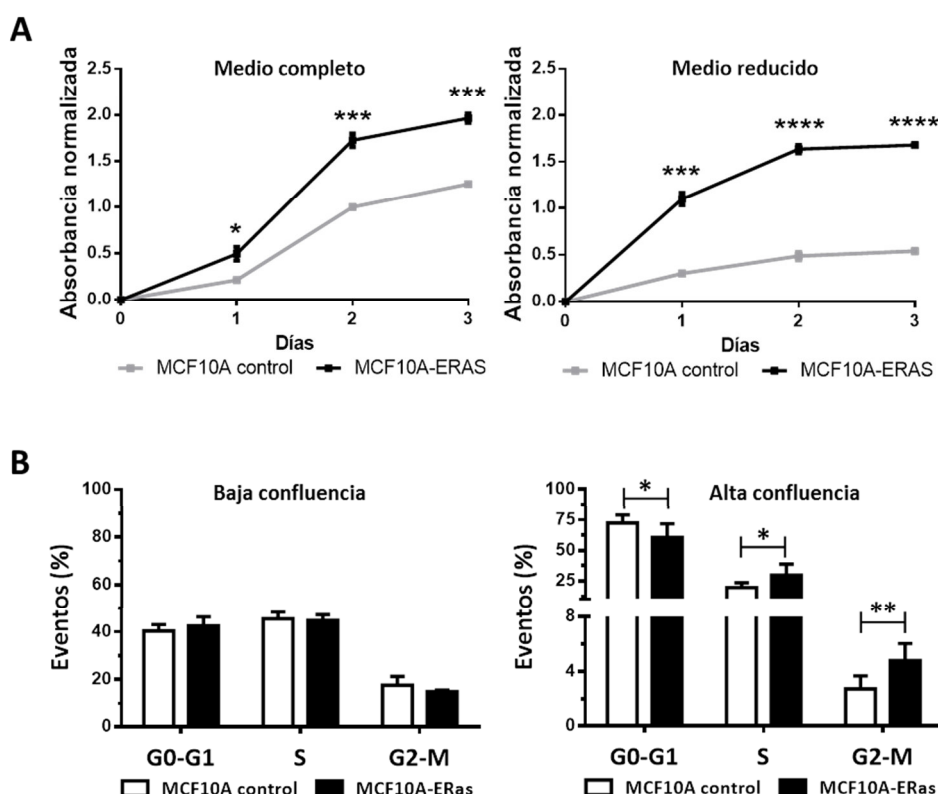
La determinación de la activación de la caspasa-3 por inmunofluorescencia nos permitió evaluar el proceso de apoptosis en el interior de los acinos. Como está descrito para células MCF10A<sup>132</sup>, encontramos activación de la caspasa-3 en el interior de los acinos, pero no en los acinos formados a partir de las células MCF10A-ERAS (**Figura 36**). A continuación, evaluamos la expresión y localización del colágeno IV y de la cadherina-E (marcadores de la membrana basal y de las uniones estrechas entre células, respectivamente). Mientras que en los acinos formados a partir de las células control se observó la presencia de una membrana basal externa marcada por la expresión del colágeno IV, en aquellos originados a partir de las células MCF10A-ERAS el colágeno IV presentó una localización aberrante, perdiéndose parcialmente en la superficie externa y estando presente también en el interior de los acinos. Esto indica que las células MCF10A-ERAS son incapaces de desarrollar acinos con una membrana basal externa y completa. Además, estos acinos también presentaron una menor tinción al emplear un anticuerpo contra la cadherina-E, así como una localización aberrante de la misma, mostrando una pérdida de adhesión entre las células del acino (**Figura 36**). Estos resultados muestran que la expresión de ERAS en las células MCF10A interfiere en la morfogénesis acinar, resultando en una desregulación de la polarización, en la inhibición de la apoptosis y en la pérdida de adhesión entre las células epiteliales.



**Figura 36. La expresión de ERAS en las células MCF10A interrumpe la correcta formación de los acinos mamarios en cultivos tridimensionales.** En la figura se muestran imágenes seriadas de un microscopio confocal en las cuales se observa la pérdida de la morfología esférica y ahuecada en los acinos que expresan ERAS. La expresión de ERAS se observó mediante el uso de un anticuerpo que reconoce el epítipo HA, mientras que el empleo de anticuerpos contra la caspasa-3 activada, la cadherina-E y el colágeno IV permitieron visualizar la apoptosis dentro de los acinos, las uniones entre células y la membrana basal, respectivamente.

### 3.2.2 - Estudio del papel de ERAS en la proliferación y migración de las células MCF10A.

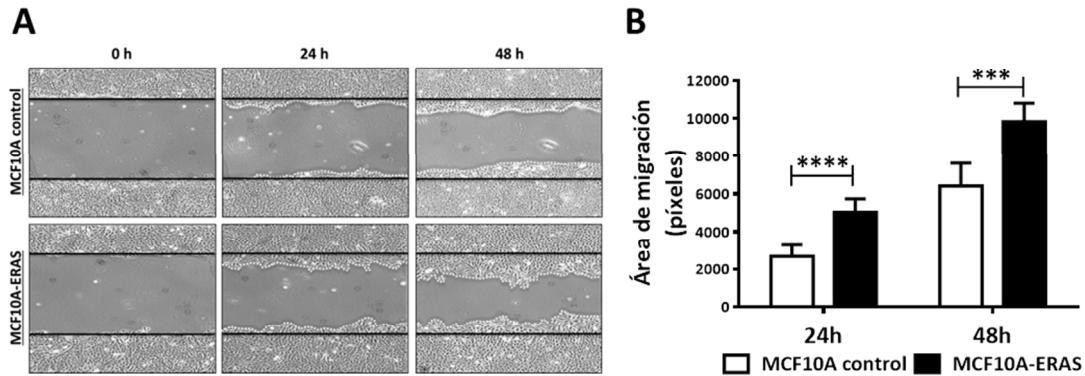
El análisis de la proliferación celular mediante ensayos colorimétricos determinó que las células MCF10A-ERAS presentan una mayor tasa de proliferación que las células MCF10A control y que, además, este efecto se exagera cuando las células son cultivadas en un medio con bajo porcentaje de suero y sin EGF (**Figura 37A**). Asimismo, estudiamos las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo en diferentes condiciones de confluencia. Cuando este ensayo se realizó en condiciones de baja confluencia (40-50%) no observamos diferencias significativas en las fases del ciclo celular entre ambos tipos celulares. Sin embargo, cuando se analizaron las células en un estado cercano a la confluencia (85-95%), se observó que las células MCF10A-ERAS presentaban un incremento en las fases S y G2/M ( $p<0,05$  y  $p<0,01$ , respectivamente) y una disminución en la fase G0-G1 ( $p<0,05$ ) respecto a las células control (**Figura 37B**), lo que sugiere que la expresión de ERAS es suficiente para superar la inhibición por contacto de la división en las células MCF10A confluentes.



**Figura 37. La expresión de ERAS induce un incremento en la proliferación de las células MCF10A.** A. Curvas de crecimiento representativas de las células MCF10A control y MCF10A-ERAS en un medio completo y en un medio reducido (con bajo porcentaje de suero y sin EGF). La proliferación fue medida usando un ensayo de proliferación XTT. Los datos representan la media de la absorbancia normalizada de 6 pocillos  $\pm$  el error estándar. B. Análisis de la distribución de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Se realizaron ensayos a baja confluencia (40-50%) y a alta confluencia (85-90%). Los datos representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$  la desviación estándar. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (\* $p<0,05$  y \*\* $p<0,01$ ).

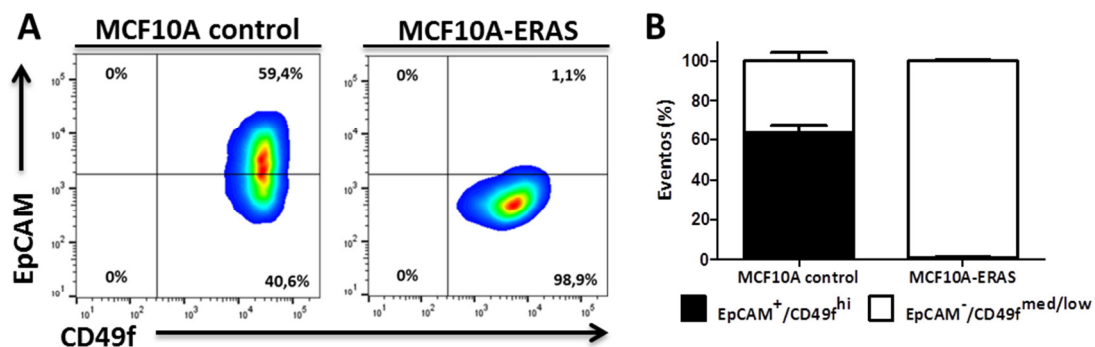


Por otro lado, estudiamos la migración celular usando un ensayo clásico de cicatrización de heridas *in vitro*. Las células MCF10A-ERAS presentaron una capacidad de migración mayor que las células control a las 24 y 48 horas después de la realización de la herida ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente; **Figura 38**).



### 3.2.3 ERAS induce características de EMT y de células madre.

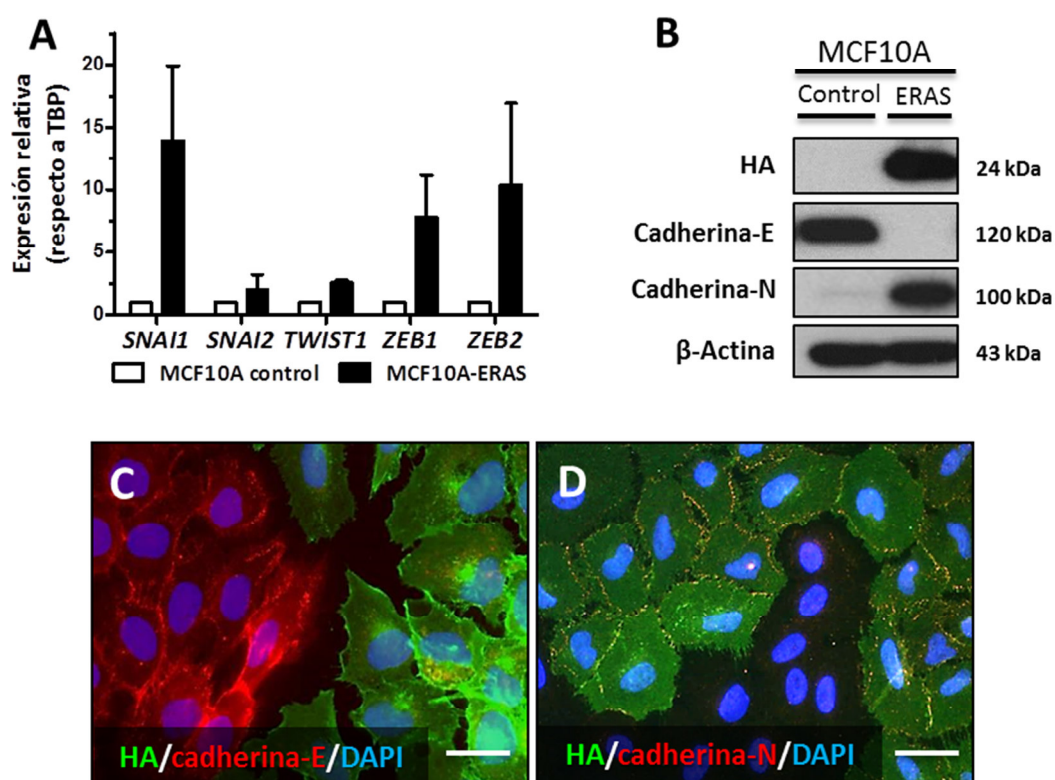
Los cambios morfológicos experimentados por las células MCF10A-ERAS sugieren la posible activación del mecanismo de EMT. Con el fin de estudiar este proceso más detalladamente, llevamos a cabo una caracterización del fenotipo epitelial y/o mesenquimal de las células MCF10A-ERAS por citometría de flujo empleando los marcadores de superficie EpCAM y CD49f. Cuando se analizaron estos marcadores en las células MCF10A control a una confluencia del 60-70%, se observaron ambas subpoblaciones: la epitelial (60%) y la mesenquimal (40%). Por el contrario, en el mismo estado de confluencia, casi todas las células MCF10A-ERAS fueron negativas para el marcador EpCAM ( $p < 0,0001$ ) y, además, mostraron un menor nivel de expresión de CD49f que las células control ( $p < 0,0001$ ), lo que indica una fuerte conversión hacia el fenotipo mesenquimal (**Figura 39**).



**Figura 39. La expresión de ERAS en las células MCF10A lleva a un fenotipo mesenquimal.** A. Gráfica representativa del análisis por citometría de flujo de los marcadores EpCAM y CD49f (integrina  $\alpha 6$ ) para

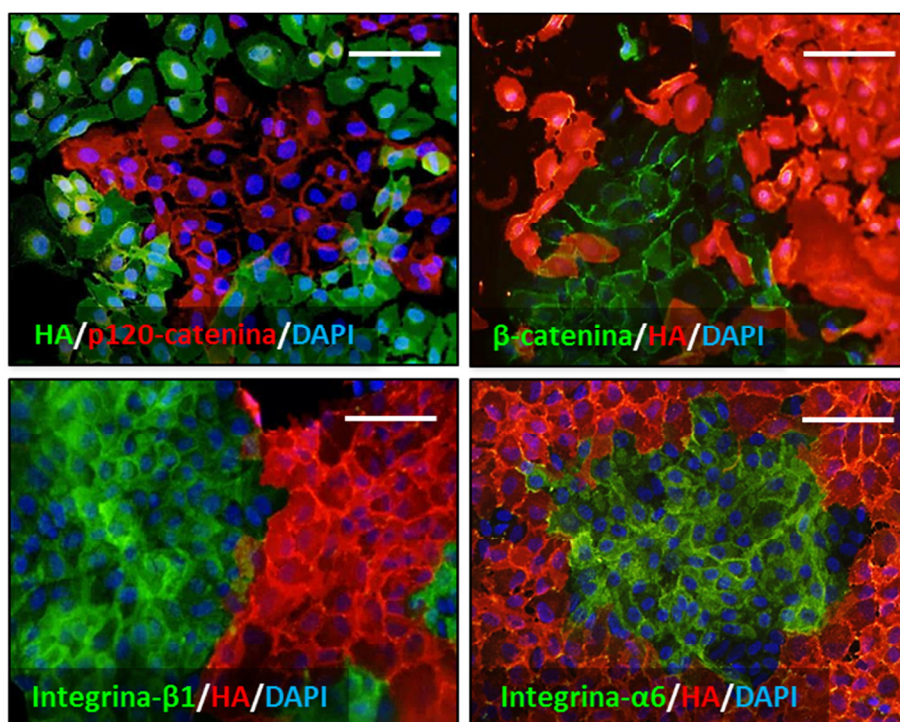
cada tipo celular. B. Cuantificación de los datos mostrados en la figura 38A. Las células MCF10A-ERAS presentan un fenotipo mesenquimal ( $p < 0,0001$ ), mientras que las células control muestran ambas subpoblaciones, la epitelial y la mesenquimal. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos.

Con el fin de caracterizar en mayor profundidad el proceso de EMT que acontece en las células MCF10A-ERAS, analizamos los niveles de expresión de *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1* y *ZEB2* mediante RT-PCR cuantitativa. Observamos un claro incremento en la expresión de estos factores de transcripción con respecto a las células control (**Figura 40A**). Acorde con este resultado, observamos mediante western blot que la expresión de ERAS induce la pérdida de expresión de la cadherina-E y la ganancia de la cadherina-N (**Figura 40B**). Este resultado fue confirmado mediante inmunofluorescencias de co-cultivos de las células control y las células positivas para el epítipo HA (**Figuras 40C y 40D**).



**Figura 40. ERAS induce el mecanismo de EMT en las células MCF10A.** A. Niveles de expresión génica de factores de transcripción implicados en el proceso de EMT medidos mediante RT-PCR cuantitativa. Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos diferentes y están normalizados respecto al gen *TBP* y respecto a las células control. B. Análisis de western blot que muestra la pérdida de la cadherina-E y la ganancia de la cadherina-N en las células MCF10A-ERAS. C y D. Inmunofluorescencias de co-cultivos celulares de células control y células que expresan ERAS. Se observa que las células positivas al epítipo HA presentan una disminución de la expresión de la cadherina-E y expresan la cadherina-N. Las barras representan 20  $\mu$ m.

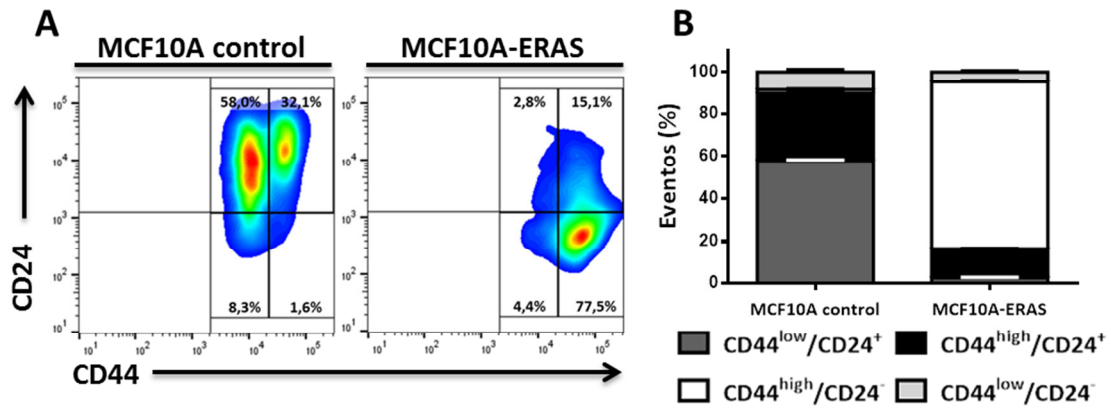
El análisis de expresión de otras moléculas de adhesión celular abundantes en las células epiteliales (como p120-catenina,  $\beta$ -catenina, integrina  $\alpha 6$  e integrina  $\beta 1$ ), mediante inmunofluorescencias de co-cultivos celulares, reveló una disminución en la expresión de estos marcadores en las células que expresaban ERAS. (**Figura 41**). En resumen, todos estos resultados indican que las células MCF10A experimentan un marcado proceso de EMT tras la expresión de ERAS.



**Figura 41. ERAS inhibe la expresión de algunas moléculas de adhesión.** Inmunofluorescencias que muestran la expresión de ERAS (epítipo HA), p120-catenina,  $\beta$ -catenina y de las integrinas  $\alpha 6$  y  $\beta 1$  en co-cultivos de células MCF10A control y MCF10A-ERAS. Las barras representan 100  $\mu$ m.

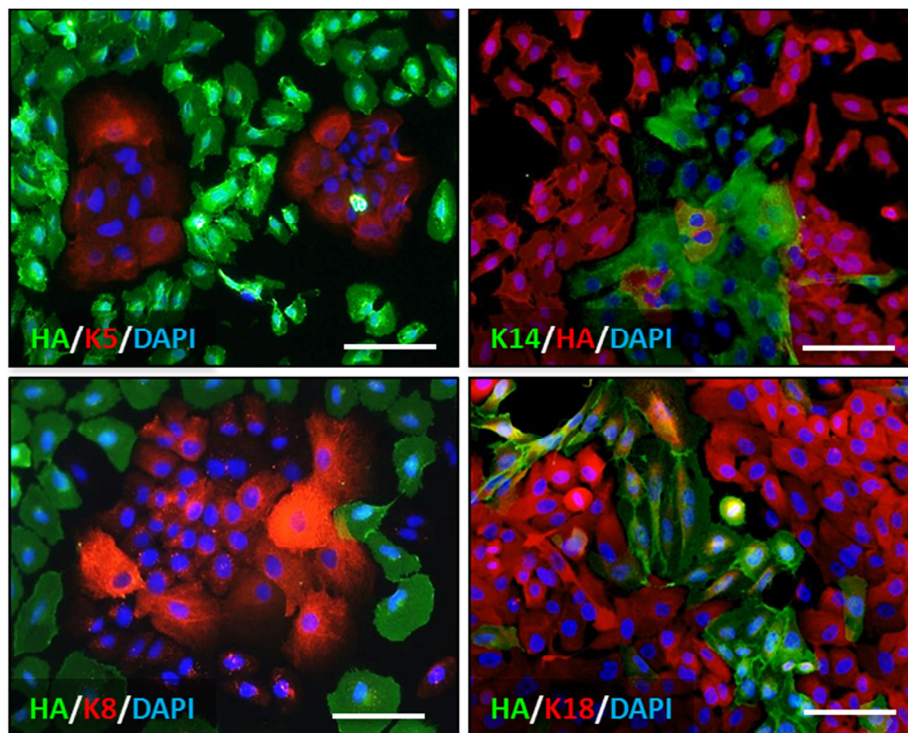
Varios estudios sugieren que las células que experimentan el proceso de EMT también pueden presentar propiedades de célula madre, teniendo una mayor capacidad migratoria e invasiva asociada con el desarrollo de metástasis<sup>49,50,130,133</sup>. Para determinar el papel de ERAS en la adquisición de características de células madre en las células epiteliales mamarias, llevamos a cabo el análisis de los marcadores de superficie CD44 y CD24 mediante citometría de flujo. La expresión forzada de ERAS en las células MCF10A resultó en un gran aumento de la población con características de células madre ( $CD44^{hi}/CD24^{-}$ ), pasando de un 1-2% en las células control a un 80% en las células MCF10A-ERAS (**Figura 42**).





**Figura 42. ERAS induce propiedades de células madre en las células MCF10A.** A. Gráfica representativa del análisis por citometría de flujo de los marcadores CD44 y CD24 para cada tipo celular. B. Cuantificación de los datos mostrados en la figura 41A. En las células control, la subpoblación CD44<sup>hi</sup>/CD24<sup>-/low</sup> representa el 1-2%, sin embargo esta población es mayoritaria (~80%) en las células MCF10A-ERAS ( $p < 0,0001$ ). Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La pérdida de marcadores específicos de linaje, como las queratinas, ha sido asociada con la capacidad de auto-renovación, con el desarrollo de mamóferas desdiferenciadas y con la elevada expresión de CD44 y la disminución de CD24<sup>134,135</sup>. Por ello, evaluamos la expresión de queratinas epiteliales y mioepiteliales (como las queratinas K8, K18, K5 y K14) en co-cultivos celulares y observamos una expresión reducida de todos estos marcadores en las células MCF10A-ERAS en comparación con las células control (**Figura 43**).



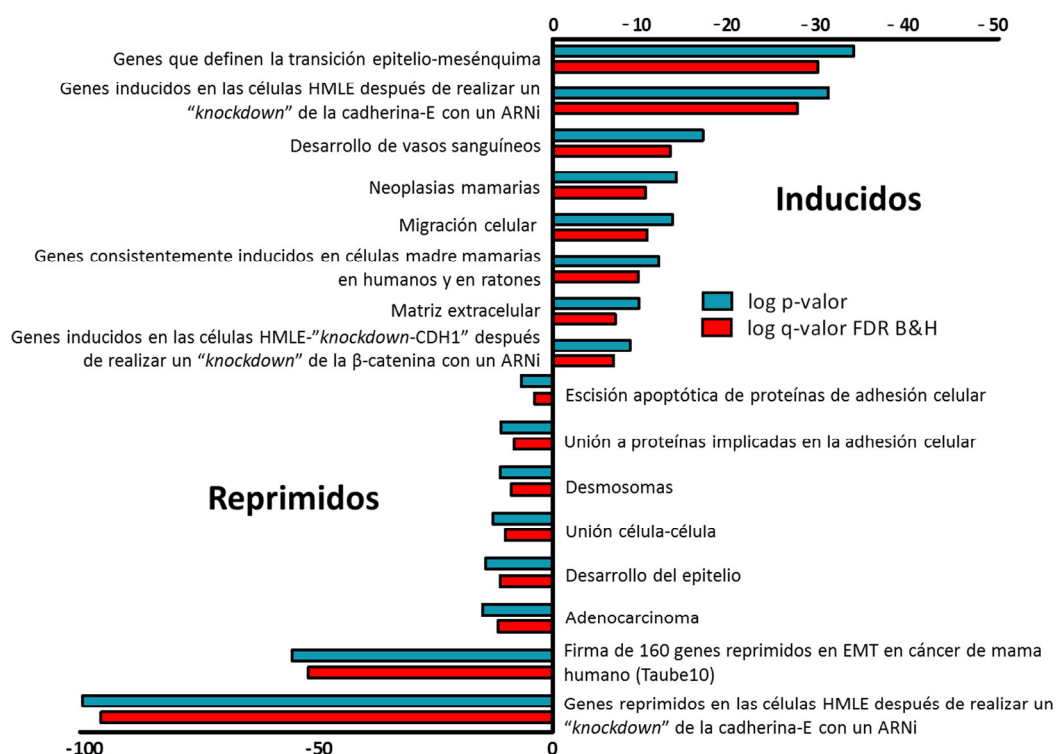
**Figura 43. ERAS inhibe la expresión de queratinas.** Inmunofluorescencias que muestran la expresión de ERAS (epítipo HA) y de las queratinas K5, K14, K8 y K18 en co-cultivos de células MCF10A control y MCF10A-ERAS. Las barras representan 100  $\mu$ m.



De forma colectiva, estos datos sugieren que la expresión del gen *ERAS* en células epiteliales mamarias humanas no tumorigénicas lleva a un marcado proceso de EMT, junto con un incremento en el número de células que expresan marcadores de células madre y/o marcadores de células tumorales.

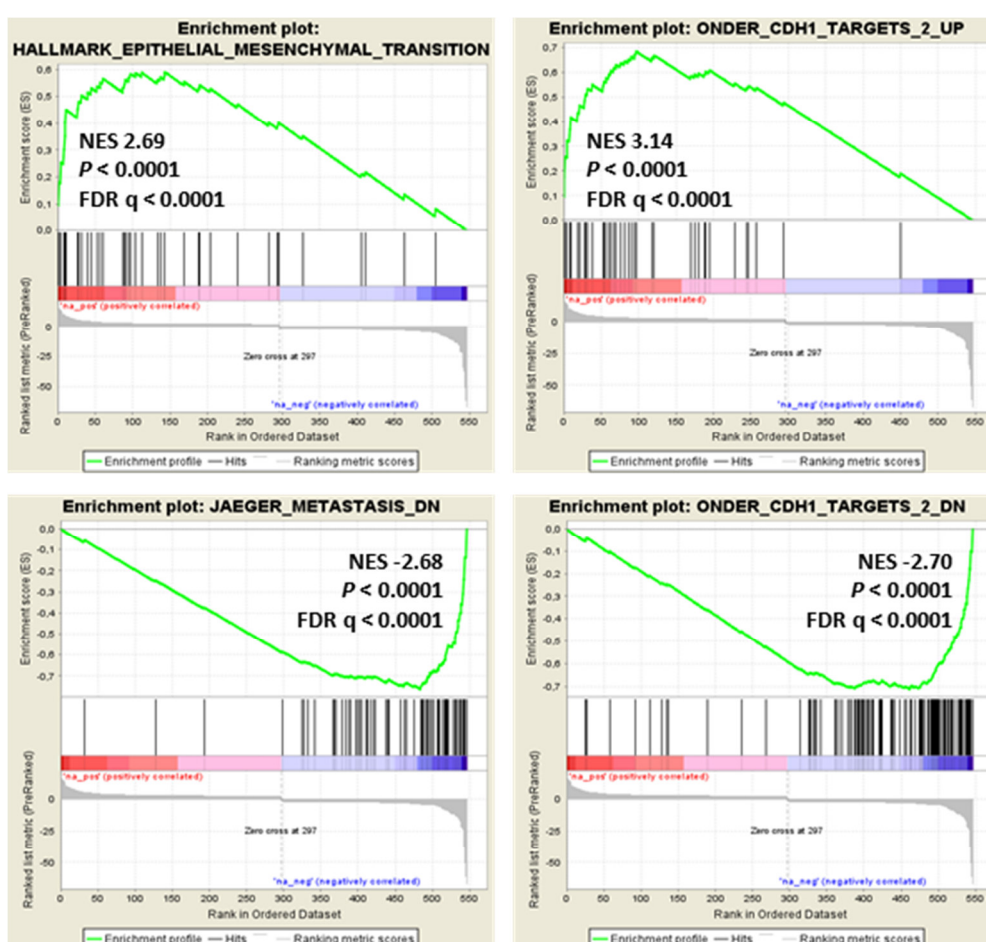
### 3.2.4 Principales vías de señalización de *ERAS*.

Con el objetivo de comprender en mayor profundidad la función de *ERAS*, llevamos a cabo un análisis transcriptómico, comparando los niveles de expresión génica de las células control y las células MCF10A-*ERAS* (**Anexo II**). El análisis de ontología génica de los genes que se expresan de forma diferencial entre ambos tipos celulares reveló una inducción significativa de genes involucrados en el proceso de EMT, en angiogénesis, en la migración celular, en la organización de la matriz celular y en el cáncer de mama, entre otras funciones (**Figura 44**), mientras que la mayoría de los genes reprimidos se asociaron con genes cuya expresión está disminuida en el proceso de EMT, en el desarrollo epitelial y en la adhesión celular (**Figura 44**). Estos resultados indican que la expresión de *ERAS* conduce hacia un fenotipo invasivo y maligno.



**Figura 44. Análisis funcional de alteraciones transcripcionales en las células MCF10A-*ERAS*.** La gráfica muestra el p-valor y la tasa corregida de falsos descubrimientos de Benjamini y Hochberg (FDR; del inglés "*False discovery rate*") de las funciones seleccionadas a partir del análisis de ontología génica de los genes inducidos y reprimidos por la expresión de *ERAS*.

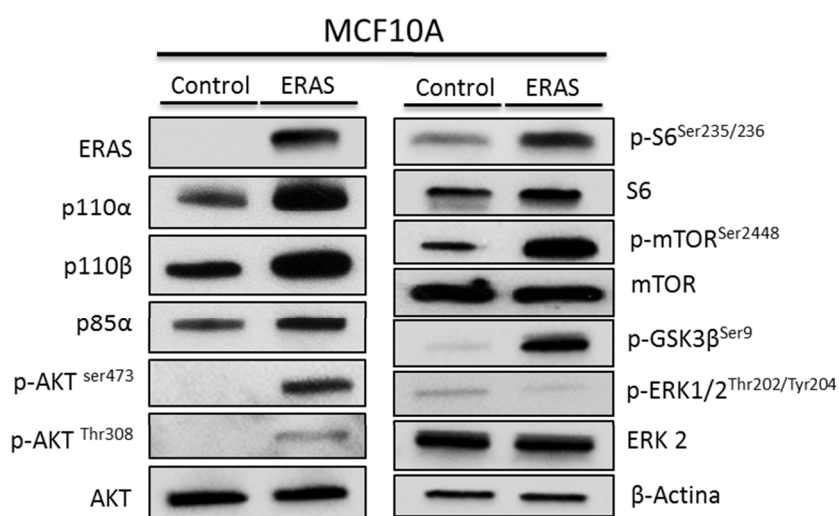
Estos resultados se confirmaron mediante el uso de un análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA). Las células MCF10A-ERAS mostraron un enriquecimiento significativo en genes inducidos en EMT (*"Hallmark EMT gene-set"*). Además, encontramos un fuerte enriquecimiento tanto en los genes inducidos como en los reprimidos dentro de la firma *"Onder\_CDH1"* (la cual incluye genes inducidos o reprimidos en las células HMLE -células epiteliales mamarias no transformadas e inmortalizadas- después de realizar un *"knockdown"* mediante un ARN interferente para la cadherina-E). Por otro lado, los genes reprimidos también presentaron una fuerte correlación con un conjunto de genes cuya expresión está disminuida en el proceso de metástasis (Figura 45).



**Figura 45. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA).** En las gráficas se observa que las células MCF10A-ERAS presentan un enriquecimiento en genes involucrados en el proceso de EMT y en la metástasis. En todos los casos el p-valor y el FDR fueron  $< 0,0001$ . NES: *"normalized enrichment score"*.

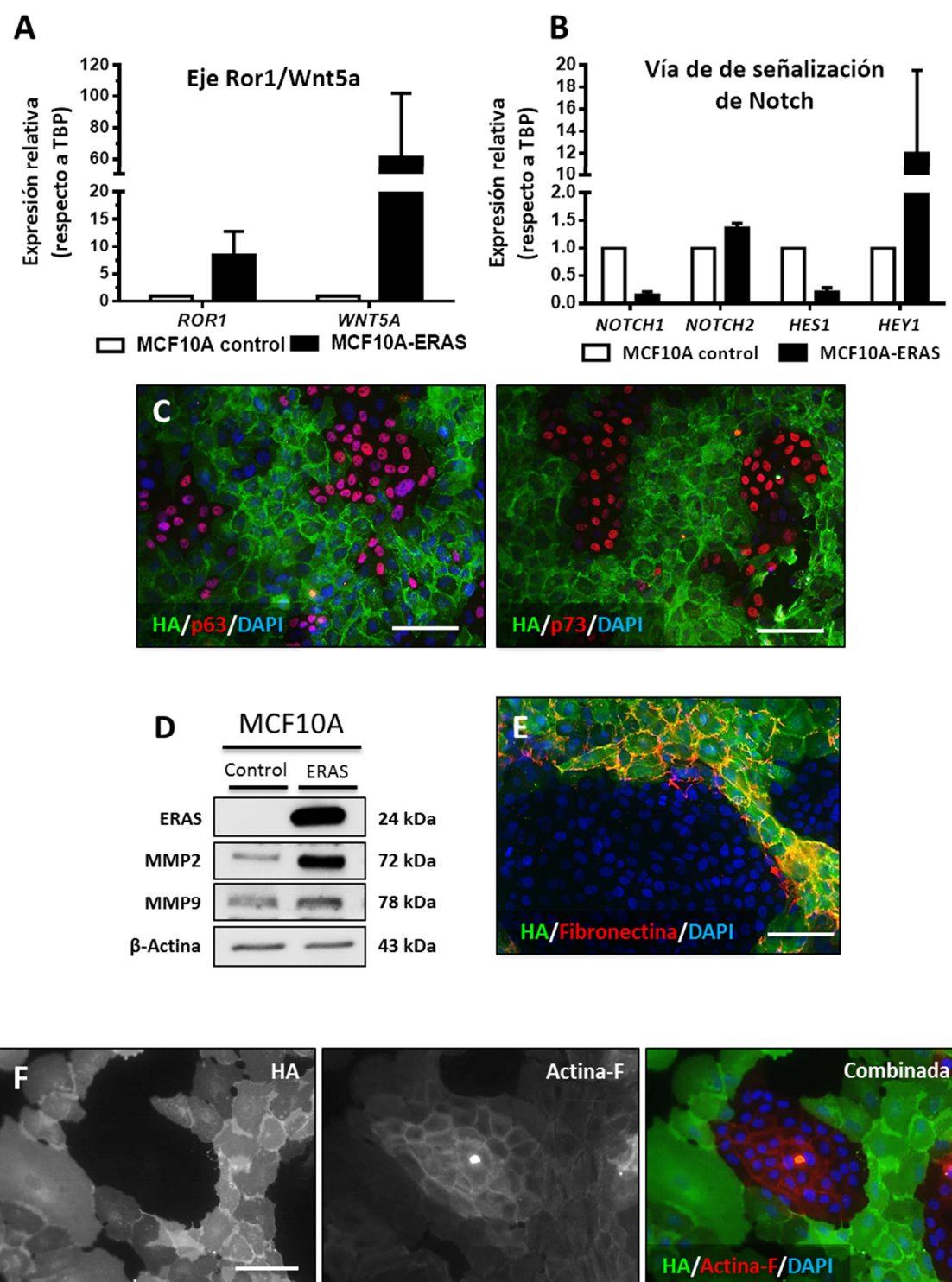
Aunque las vías de señalización de MAPK y de PI3K son las principales efectoras de las Ras-GTPasas clásicas, se ha demostrado que ERAS no puede activar la vía de MAPK en diferentes tipos celulares. En su lugar, ERAS señala a través de PI3K, activando AKT y promoviendo así la proliferación celular<sup>104,106,108,131,136,137</sup>. Para confirmar la activación de esta ruta molecular en las

células MCF10A-ERAS, estudiamos la expresión de varias subunidades de PI3K (las subunidades catalíticas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$ , y la subunidad reguladora p85 $\alpha$ ), AKT y otros efectores moleculares de esta vía (tales como mTOR, la proteína S6 ribosomal o GSK3 $\beta$ ). De acuerdo con lo reportado por otros, las células que expresan ERAS mostraron una fuerte activación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, mientras que la vía de las MAP quinasas (analizada mediante la fosforilación de ERK en los residuos T202 e Y204) no se encontró activada (**Figura 46**). La vía de AKT es un importante regulador del ciclo celular y la supervivencia, estando constitutivamente activada en muchos tipos de cáncer y siendo, por lo tanto, una diana terapéutica de interés.



**Figura 46. Activación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en las células MCF10A-ERAS.** Para llevar a cabo estos análisis, las células se cultivaron durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70%. A continuación, se mantuvieron en un medio sin suero ni suplementos durante 12 horas, hasta el momento de la lisis. Observamos un aumento en los niveles de fosforilación de todos los efectores analizados de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, pero no de ERK.

Por otro lado, también observamos alteraciones en otras vías de señalización inducidas por la expresión de ERAS, como la activación del eje ROR1/WNT5A (**Figura 47A**), la desregulación de la vía de NOTCH (**Figura 47B**) y la represión de p63 y p73 (**Figura 47C**). También observamos un incremento de metaloproteasas (como MMP2 y MMP9) (**Figura 47D**) y un aumento de la fibronectina (**Figura 47E**), poniendo de manifiesto la posible implicación de ERAS en la modificación de la matriz extracelular. Además, observamos una disminución de los filamentos de F-actina, sugiriendo que la expresión de ERAS da lugar a un proceso de despolimerización de la actina (**Figura 47F**). En su conjunto, nuestros resultados avalan que ERAS es capaz de actuar a través de múltiples vías de señalización, promoviendo el crecimiento, la invasión y el proceso de EMT.



**Figura 47. La expresión de ERAS en las células MCF10A modifica múltiples vías de señalización.** A y B. Las gráficas muestran los valores relativos de expresión génica de *ROR1*, *WNT5A* y de algunos miembros de la vía de señalización de Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *HES1* y *HEY1*) medidos mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes y están normalizados respecto a la expresión del gen *TPB* y respecto a las células control. C. Inmunofluorescencias de ERAS (epítipo HA), p63 y p73 en co-cultivos de células MCF10A control y MCF10A-ERAS. D. Incremento en los niveles de expresión de las metaloproteasas MMP2 y MMP9 en las células MCF10A-ERAS analizados mediante western blot. E y F. Inmunofluorescencias del epítipo HA, la fibronectina y la actina-F en co-cultivos celulares de células control y células que expresan ERAS. Las barras representan 100  $\mu$ m.

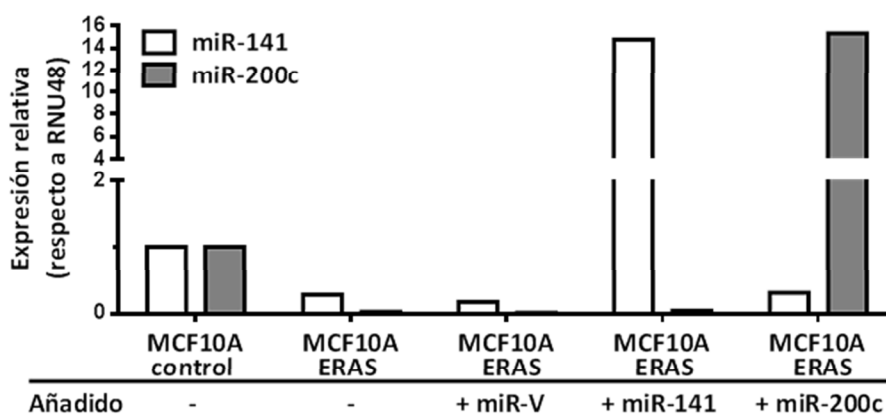
### 3.2.5 ERAS modula el proceso de EMT a través de la familia miR-200.

El análisis transcriptómico mostró una fuerte reducción en los niveles de expresión de algunos miARNs en las células MCF10A-ERAS con respecto a las células control, especialmente de miR-205, miR-200c y miR-141. La disminución de estos miARNs se confirmó mediante RT-PCR cuantitativa (Tabla 10).

	HTA 2.0	RT-qPCR
miR-205	-50,38	-3392,12
miR-200c	-2,48	-113,30
miR-141	-5,72	-98,75

**Tabla 10.** ERAS reprime los miRNA miR-205, miR-200c y miR-141 en las células MCF10A. La tabla representa los niveles relativos de expresión de los miARNs en las células MCF10A-ERAS con respecto a las células control. Los resultados fueron obtenidos a partir de los “microarrays HTA 2.0” y los análisis de RT-PCR cuantitativa.

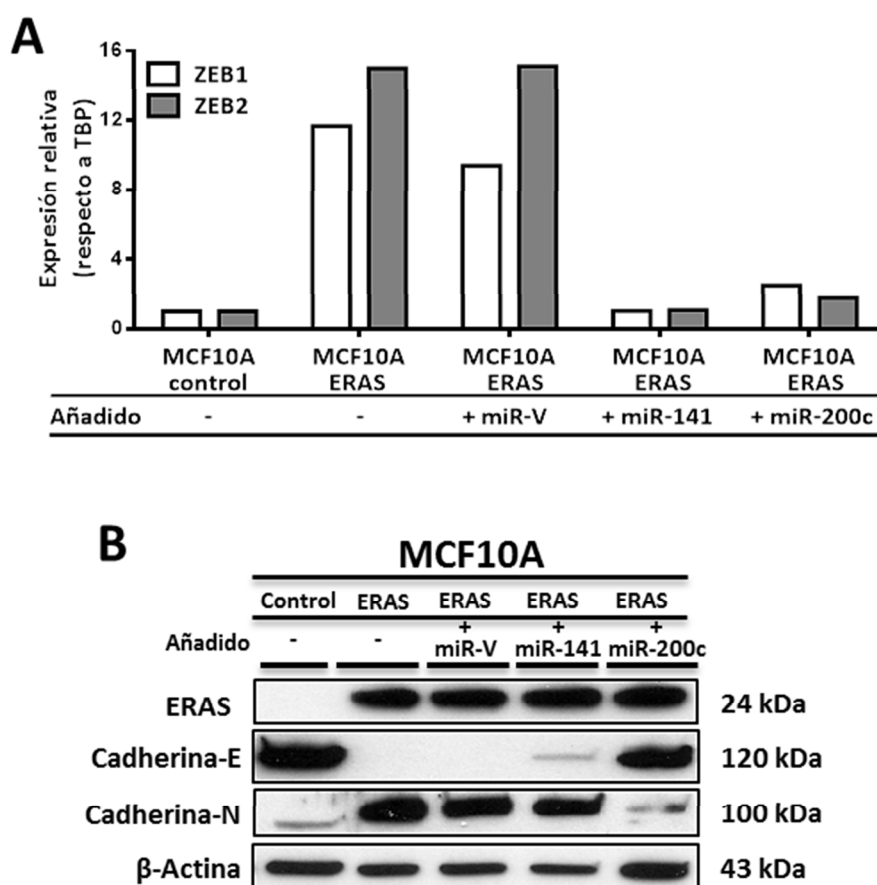
La familia miR-200 y miR-205 son miARNs cuya expresión se encuentra frecuentemente reducida en varios tipos de cáncer. En el cáncer de mama, miR-205 se considera un supresor tumoral, inhibiendo el crecimiento celular, el crecimiento independiente de anclaje y la invasión. La disminución de los niveles de expresión de miR-205 está asociada con el cáncer de mama triple negativo<sup>138,139</sup>. La reducción de los niveles de expresión de los miembros del grupo II de la familia miR-200 (es decir, miR-200c y miR-141), los cuales inhiben a los factores de transcripción *ZEB1* y *ZEB2*, ha sido relacionada en el proceso de EMT<sup>140,141</sup>. Además, los niveles de expresión reducidos de estos miARNs han sido asociados con el cáncer de mama triple negativo, y con los subtipos basal y “*claudin-low*”<sup>142,143</sup>. Con el fin de comprobar si ERAS modula el proceso de EMT mediante la regulación de miR-200c y miR-141, reintroducimos por separado ambos miRNAs en las células MCF10A-ERAS (Figura 48).



**Figura 48.** Sobreexpresión de miR-200c y miR-141 en las células MCF10A-ERAS. La gráfica muestra los niveles de expresión relativos de miR-200c y miR-141 en las células MCF10A-ERAS tras su sobreexpresión. Los niveles de expresión se midieron mediante RT-PCR cuantitativa y fueron normalizados con respecto a la expresión de ARN nuclear *RNU48* y con respecto a las células control.

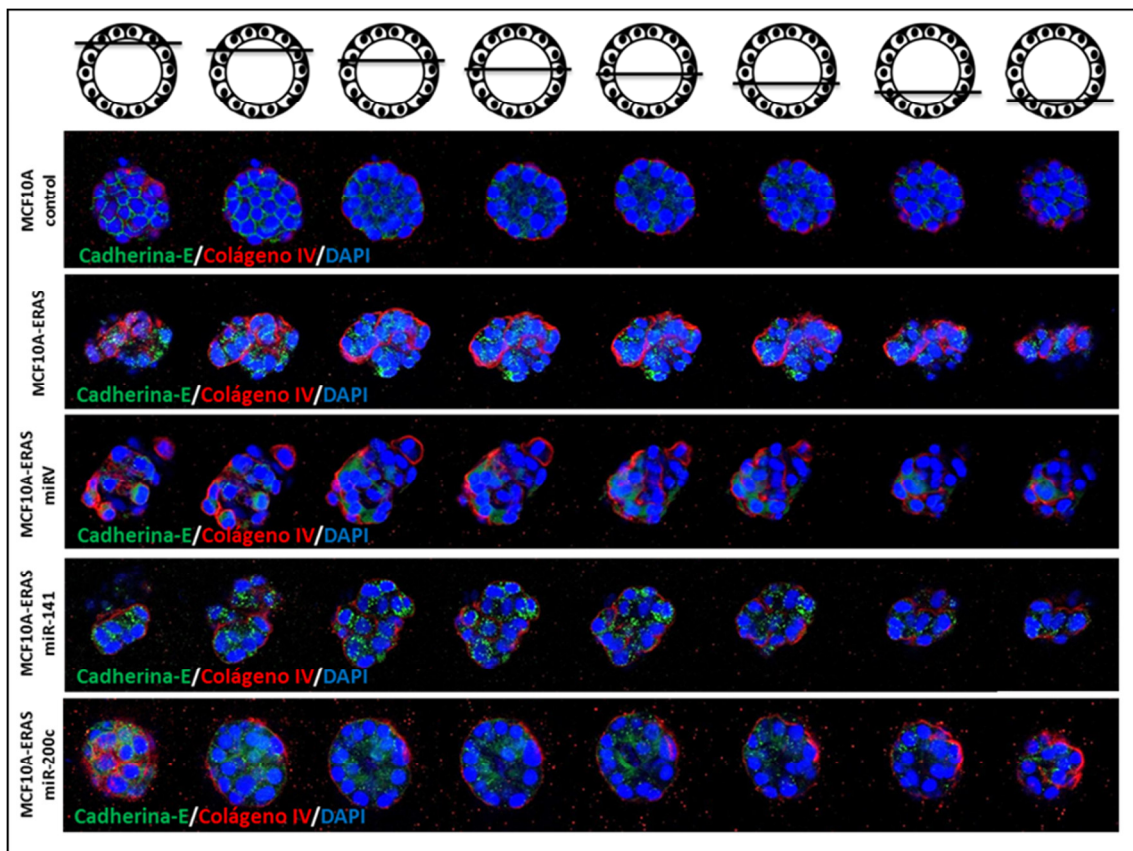


La sobreexpresión de miR-200c en las células MCF10A-ERAS produjo cambios fenotípicos evidentes, recobrando una forma poligonal en lugar de la morfología fusiforme de las células MCF10A-ERAS y experimentando un aumento de adhesión al substrato. Tras la sobreexpresión de miR-200c en las células MCF10A-ERAS, la expresión de los factores de transcripción *ZEB1* y *ZEB2* retornó a niveles similares a las células control, revirtiendo el aumento de expresión inducido por ERAS (**Figura 49A**). Además, la reintroducción de miR-200c incrementó los niveles de la cadherina-E hasta valores similares a los de las células MCF10A control, disminuyendo a su vez la expresión de la cadherina-N (**Figura 49B**). Por el contrario, cuando miR-141 se sobreexpresó en las células MCF10A-ERAS, la expresión de la cadherina-E solo se recuperó parcialmente y los niveles de la cadherina-N fueron invariables (**Figura 49B**), incluso aunque los niveles de *ZEB1* y *ZEB2* retornaron a niveles normales (**Figura 49A**). Estos resultados sugieren que la represión de miR-200c es un evento esencial para que tenga lugar el proceso de EMT inducido por ERAS.



**Figura 49. La sobreexpresión de miR-200c y miR-141 revierte el proceso de EMT en las células MCF10A-ERAS.** A. La gráfica representa los niveles de expresión de los factores de transcripción *ZEB1* y *ZEB2* en las células MCF10A-ERAS cuando reintroducimos los miARNs miR-200c y miR-141. Los valores fueron normalizados con respecto a la expresión del gel *TBP* y con respecto a las células control. B. Niveles de expresión de las cadherinas-E y -N en las células MCF10A-ERAS tras la sobreexpresión de los miARNs analizados mediante western blot.

Para estudiar el papel de miR-200c y miR-141 en la morfogénesis acinar aberrante de las células MCF10A-ERAS, llevamos a cabo cultivos tridimensionales tras la sobreexpresión de ambos miARNs. Los acinos formados a partir de las células MCF10A-ERAS-miR200c recobraron su morfología esférica y ahuecada, mientras que esta recuperación fue parcial en las células MCF10A-ERAS-miR-141 (**Figura 50**). En su conjunto, estos resultados indican que ERAS induce una fuerte inhibición del grupo II de la familia miR-200, provocando de esta manera una modulación significativa del proceso de EMT, que parece estar mediada principalmente por miR200c.

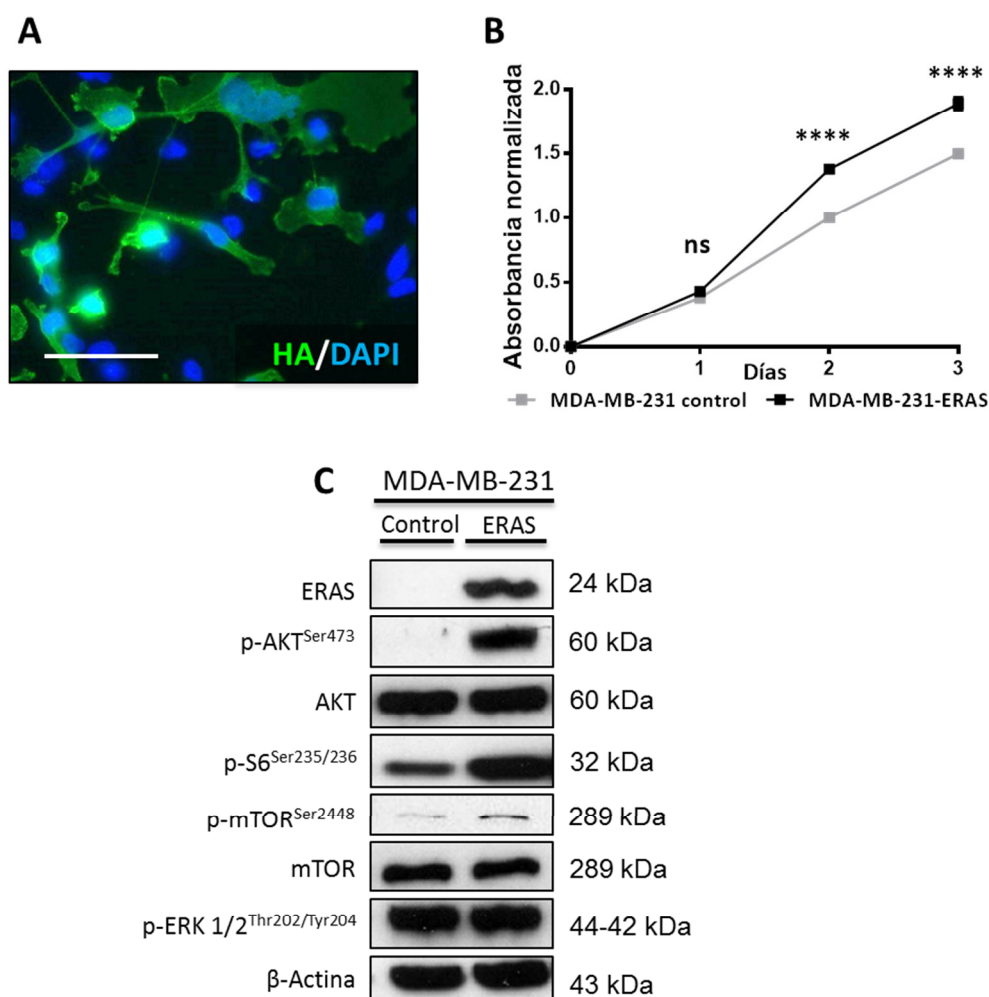


**Figura 50. Papel de miR-141 y miR-200c en la morfogénesis acinar.** En la figura se muestran imágenes seriadas de un microscopio confocal en las cuales se observa la recuperación parcial de la morfología esférica y ahuecada de los acinos que expresan ERAS tras la sobreexpresión de miR141 y miR-200c. Se emplearon anticuerpos contra la cadherina-E y el colágeno IV como marcadores de las uniones entre células y la membrana basal, respectivamente.

### 3.3 Estudio de la expresión de ERAS en células tumorales mamarias humanas.

Para determinar el papel de ERAS en un contexto tumoral empleamos la línea celular MDA-MB-231. Estas células fueron derivadas desde un adenocarcinoma mamario metastásico y dan lugar a adenocarcinomas pobremente diferenciados cuando son inyectadas en ratones inmunodeficientes Foxn1<sup>nu/nu</sup>. Generamos células MDA-MB-231 que expresasen ERAS de forma permanente (en adelante, células MDA-MB-231-ERAS) y analizamos la expresión, localización y

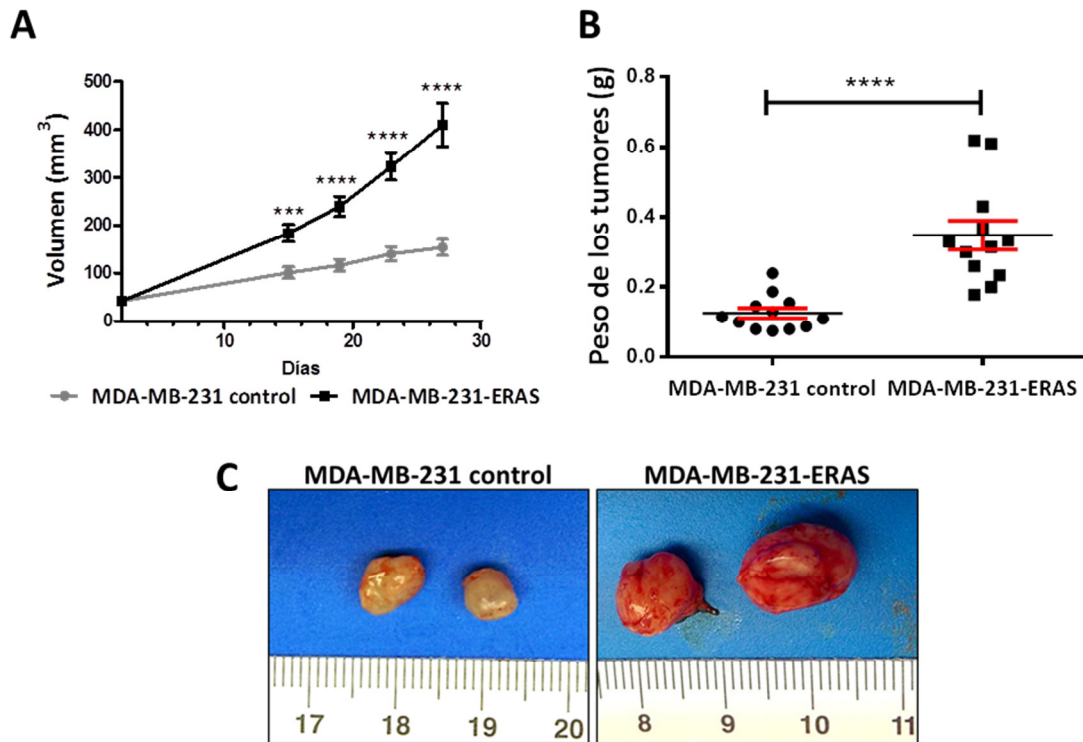
funcionalidad de ERAS en las mismas. Las células MDA-MB-231-ERAS reprodujeron algunos de los hallazgos observados en las células MCF10A, tales como la localización de la proteína, la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR y el aumento de la proliferación (**Figura 51**).



**Figura 51. Expresión de ERAS en las células tumorales MDA-MB-231.** A. Detección por inmunofluorescencia del epítipo HA asociado a ERAS en las células MDA-MB-231-ERAS. Se observa tinción en la membrana plasmática y en el citoplasma. La barra representa 100  $\mu$ m. B. Curva de crecimiento representativa de las células MDA-MB-231 control y las MDA-MB-231-ERAS. La proliferación fue medida usando un ensayo de proliferación XTT. Los datos representan la media de la absorbancia normalizada  $\pm$  el error estándar. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ). ns: no significativo. C. Activación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en las células MDA-MB-231-ERAS analizada mediante western blot.

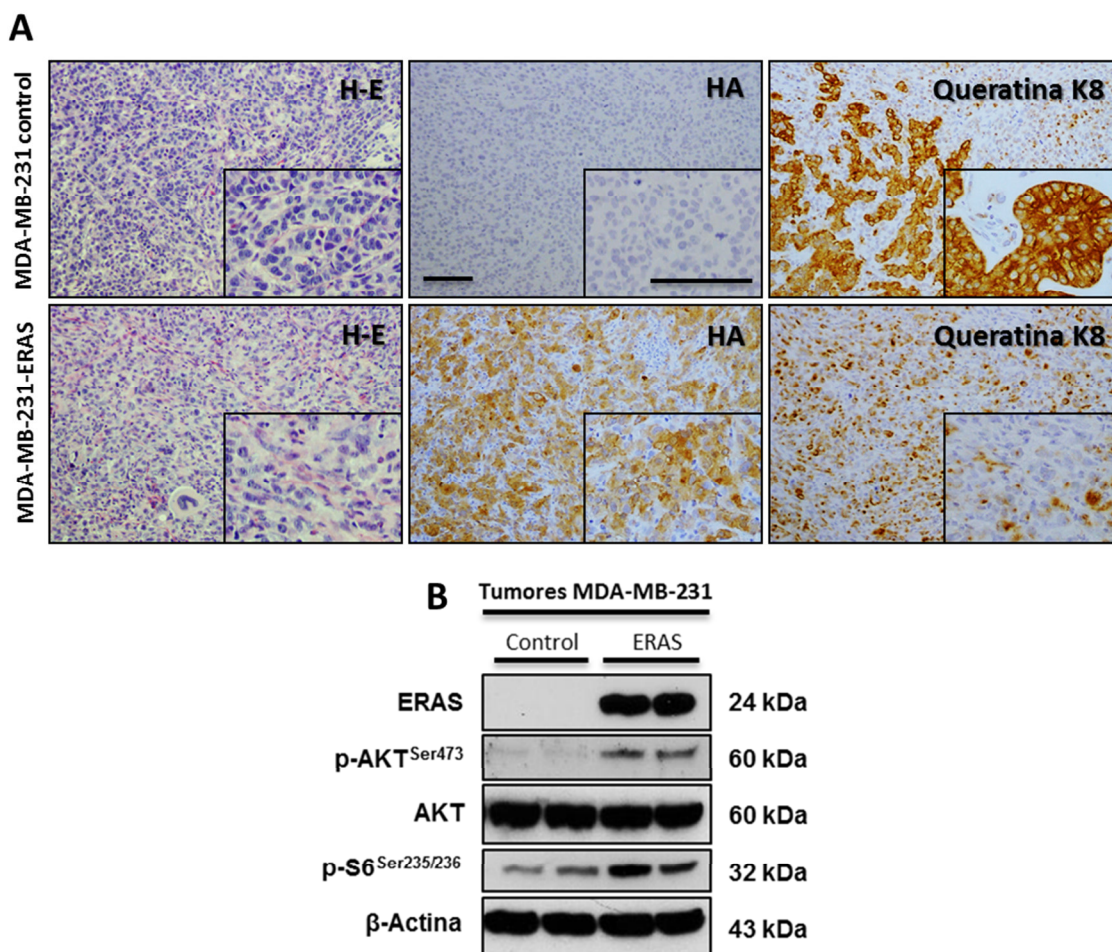
Con el fin de evaluar el papel de ERAS *in vivo*, llevamos a cabo xenoinjertos ortotópicos de las células MDA-MB-231 en la almohadilla adiposa ("fat pad") de ratonas Foxn1<sup>nu/nu</sup>. Los tumores que se originaron a partir de las células tumorales que expresaban ERAS fueron de mayor tamaño y crecieron más rápido que aquellos originados a partir de las células control (**Figura 52A y 52B**). Además, pudimos observar una mayor irrigación en aquellos tumores que expresaban ERAS, sugiriendo que su expresión puede promover la angiogénesis en un contexto tumoral (**Figura 52C**).





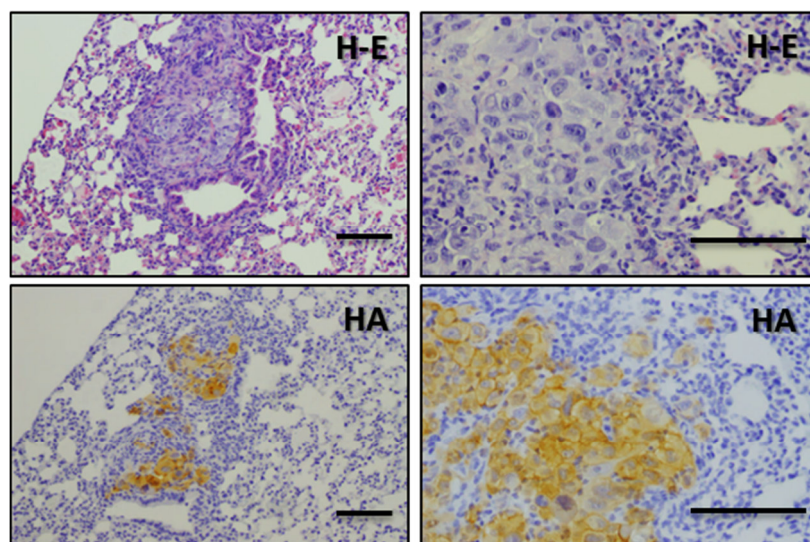
**Figura 52. Las células MDA-MB-231-ERAS generan tumores de mayor tamaño tras su xenoinjerto en ratones inmunodeficientes.** A. Curva de crecimiento de los tumores generados a partir de las células MDA-MB-231 control (n=12) and MDA-MB-231-ERAS (n=12) en un ensayo de xenoinjerto en ratonas *Foxn1<sup>nu/nu</sup>*. Los tumores fueron medidos los días 15, 19, 23 y 27 después de la inyección. B. Peso de los tumores extraídos el día 27 después de la inyección en ambos grupos. En A y B los datos están representados como la media  $\pm$  el error estándar. Los asteriscos muestran las diferencias significativas (\*\*\*) $p < 0,001$  and (\*\*\*\*) $p < 0,0001$ . C. Imagen representativa mostrando dos de los tumores de cada genotipo el día 27 después de la inyección.

Además, observamos que los tumores formados por las células MDA-MB-231-ERAS eran menos diferenciados histológicamente que los de las células control, siendo difícil hallar estructuras acinares o ductales. Con el propósito de confirmar estas observaciones, estudiamos la expresión de la queratina K8, un marcador de células luminales que se expresa en ductos diferenciados de muchos carcinomas mamarios<sup>144</sup>. Como se esperaba, todos los tumores originados a partir de las células control (n=12) presentaron focos de diferenciación positivos para la queratina K8, mientras que estos focos no se observaron en ninguno de los tumores que expresaban ERAS (n=12). En estos tumores, solamente algunas células aisladas fueron positivas a la queratina K8, siendo incapaces de formar estructuras acinares o ductales y confirmando el menor grado de diferenciación de los tumores derivados de las células MDA-MB-231-ERAS (**Figura 53A**). Asimismo, comprobamos que los tumores que expresaban ERAS mostraban una activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR (**Figura 53B**).



**Figura 53.** Las células MDA-MB-231-ERAS generan tumores más indiferenciados que las células control y presentan activación de la vía de señalización de AKT. A. Análisis de la activación de la vía de señalización de AKT mediante western blot. B. Caracterización histológica de los tumores generados mediante el xenoinjerto de las células MDA-MB-231-ERAS en ratones desnudos. Se muestran las tinciones de hematoxilina-eosina y las inmunohistoquímicas del epítipo HA y de la queratina K8. Las barras representan 100  $\mu$ m. Los recuadros muestran una imagen a mayores aumentos para cada tinción.

Para determinar si ERAS aumenta la capacidad metastásica de las células MDA-MB-231, realizamos una extirpación quirúrgica de los tumores primarios generados a partir del xenoinjerto 27 días después de la inyección. Un mes después de la cirugía, llevamos a cabo un estudio histológico de tres órganos diana de metástasis (los pulmones, el hígado y el cerebro). A pesar de que las células MDA-MB-231 tienen capacidad metastásica, en estas condiciones no observamos metástasis en ninguno de estos tejidos en los ratones del grupo control (n=6). Por el contrario, el 50% de los ratones que fueron inyectados con las células MDA-MB-231-ERAS (n=6) presentaron metástasis en los pulmones, las cuales conservaban la expresión de ERAS (Figura 54).

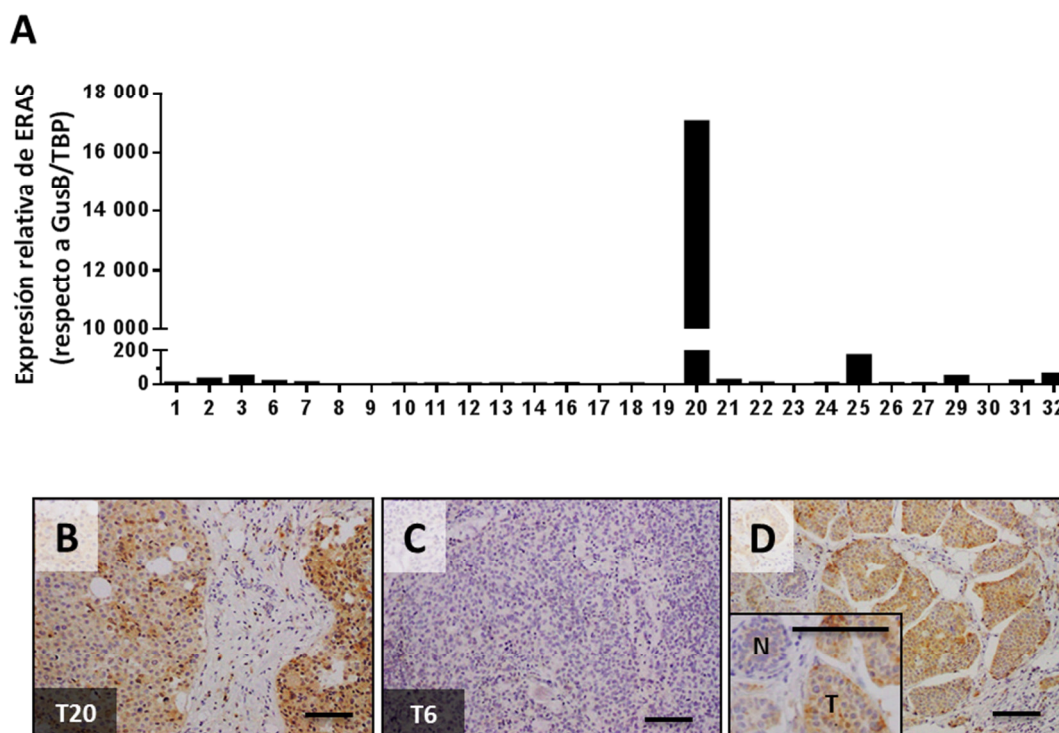


**Figura 54. ERAS incrementa la capacidad metastásica de las células MDA-MB-231.** Imágenes histológicas de metástasis pulmonares de los ratones inmunodeficientes un mes después de la extirpación de los tumores originados por las células MDA-MB-231-ERAS. Se muestran las tinciones de hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica del epítipo HA en un corte próximo. Las barras representan 100  $\mu$ m.

En resumen, *ERAS* promueve la progresión, invasión y dediferenciación de los tumores generados mediante el xenoinjerto de las células MDA-MB-231 e incrementa la capacidad metastásica de esta línea celular triple negativa.

### 3.4 Expresión de *ERAS* en tumores de mama humanos.

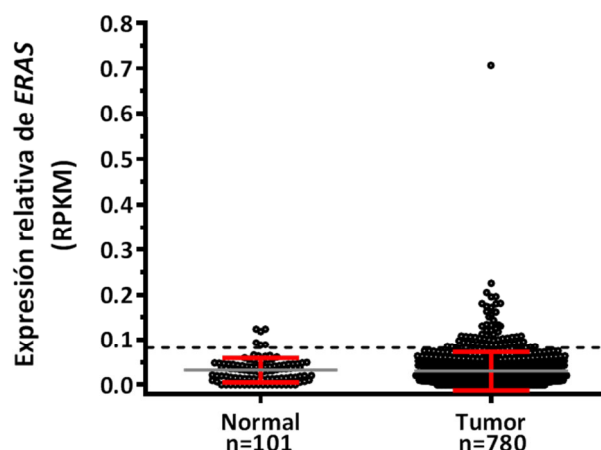
Nuestros resultados indican claramente que *ERAS* puede actuar como un oncogén cuando se expresa en células epiteliales de la glándula mamaria; sin embargo, la expresión de *ERAS* en tumores de mama humanos no ha sido descrita hasta el momento. Para evaluar esta posibilidad, analizamos la expresión de *ERAS* en una colección de 32 tumores de mama humanos. El análisis de expresión génica de estos tumores por RT-PCR cuantitativa determinó que solo uno de ellos presentaba niveles elevados del ARN mensajero de *ERAS*, mientras que el resto de los tumores mostraron señales nulas o de fondo (**Figura 55A**). El análisis inmunohistoquímico de los tumores corroboró que solamente el tumor que presentaba los niveles más altos de expresión de ARN mensajero fue positivo para la tinción con el anticuerpo anti-*ERAS*, mientras que todos los demás tumores no presentaron niveles detectables de la proteína (**Figuras 55B y 55C**). Por otra parte, también encontramos otro tumor positivo a la tinción de *ERAS* en un “microarray” de tejido (TMA; del inglés “*Tissue microarray*”) que contenía 47 muestras de cáncer de mama (**Figura 55D**). No dispusimos de ARN mensajero de estas muestras.



**Figura 55. El gen *ERAS* se expresa en algunos tumores humanos.** A. La gráfica muestra los niveles de expresión relativos de *ERAS* medidos mediante RT-PCR cuantitativa en una serie de tumores de mama humanos (n=28). Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión de los genes *GUSB* y *TBP*. Las imágenes B, C y D muestran inmunohistoquímicas de tumores de mama humanos empleando un anticuerpo anti-*ERAS*. Las imágenes B y D muestran tinciones positivas para *ERAS* mientras que la imagen C es un ejemplo de una tinción negativa. Las barras representan 100  $\mu$ m. El recuadro de la imagen D muestra una región del tumor a mayores aumentos donde podemos observar una zona normal (N) con tinción negativa y una zona tumoral (T) con tinción positiva. La identificación de los tumores (T6 y T20) se indica en la esquina inferior izquierda y corresponden con la numeración de los tumores de la figura 55A. El tumor de la figura 55D corresponde a una muestra independiente sin datos de expresión mediante RT-PCR cuantitativa.

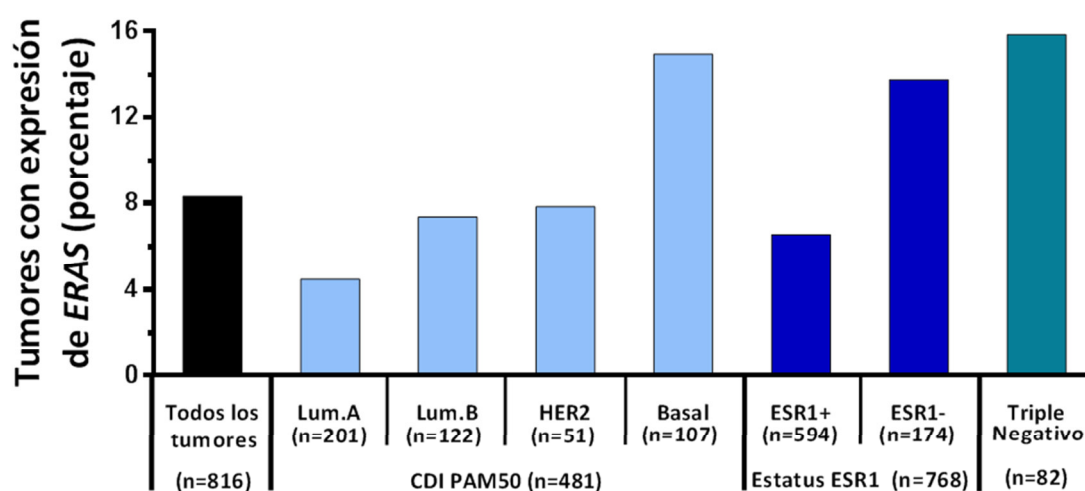
Para expandir nuestros resultados, usamos la base de datos “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA) para evaluar los niveles de expresión de *ERAS* en los tumores mamarios. El análisis de estos niveles de expresión en las muestras normales (n=101) y tumorales (n=708) reveló que aproximadamente el 8% de los tumores presentaban valores de expresión de *ERAS* por encima del umbral establecido, es decir, dos desviaciones estándar por encima del valor medio de expresión de las muestras control ( $\sim 0,08$  RPKM) (**Figura 56**).





**Figura 56. Niveles de expresión de ERAS en muestras mamarias humanas normales y tumorales.** Datos extraídos de la base de datos TCGA. Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar. La línea de puntos representa el valor umbral a partir del cual consideramos la expresión de *ERAS*.

Con el objetivo de establecer si la expresión aberrante de *ERAS* es característica de algún subtipo tumoral, comparamos el porcentaje de tumores que presentaban niveles elevados de *ERAS* (es decir, aquellos con un niveles de expresión superior a dos desviaciones estándar por encima del valor medio de expresión de las muestras control) entre los diferentes subtipos de la firma PAM50 y según su estatus de ESR1. Para ello, usamos la cohorte “Cell 2015” desde el “cBioPortal for Cancer Genomics” ([www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org))<sup>47,119</sup>. Según estos datos, el porcentaje de tumores que presentan niveles elevados de expresión de *ERAS* es mayor dentro del subtipo basal y en los tumores triple negativos que en el resto de grupos (test exacto de Fisher;  $p < 0,01$  en ambos casos; **Figura 57**). Además, también encontramos un mayor porcentaje de tumores con expresión de *ERAS* en el grupo ESR1 negativo cuando se comparó con los tumores ESR1 positivos (test exacto de Fisher;  $p < 0,01$ ; **Figura 57**).



**Figura 57. *ERAS* se expresa principalmente en los tumores de mama del subtipo basal o triple negativo.** La gráfica muestra el porcentaje de tumores que expresan *ERAS* dentro de los diferentes subtipos de cáncer de mama. Los datos fueron obtenidos desde cBioPortal. Se compararon los subtipos de la firma PAM50 dentro de los carcinomas ductales invasivos (CDI PAM50), el estatus del receptor de estrógenos y los tumores triple negativos.

Por otro lado, cuando comparamos los niveles medios de expresión de *ERAS* de todos los tumores dentro de cada subtipo tumoral, observamos que los tumores de tipo basal presentaban niveles de expresión mayores que el resto de subtipos (test “*t*” de “*student*”; **Tabla 11**). Del mismo modo, los tumores ESR1 negativos mostraron niveles de expresión más elevados que los ESR1 positivos (test “*t*” de “*student*”; **Tabla 11**). En su conjunto, estos resultados sugieren que la activación de *ERAS*, aunque no ocurre con demasiada frecuencia, podría ser un evento importante en un subconjunto de tumores mamarios.

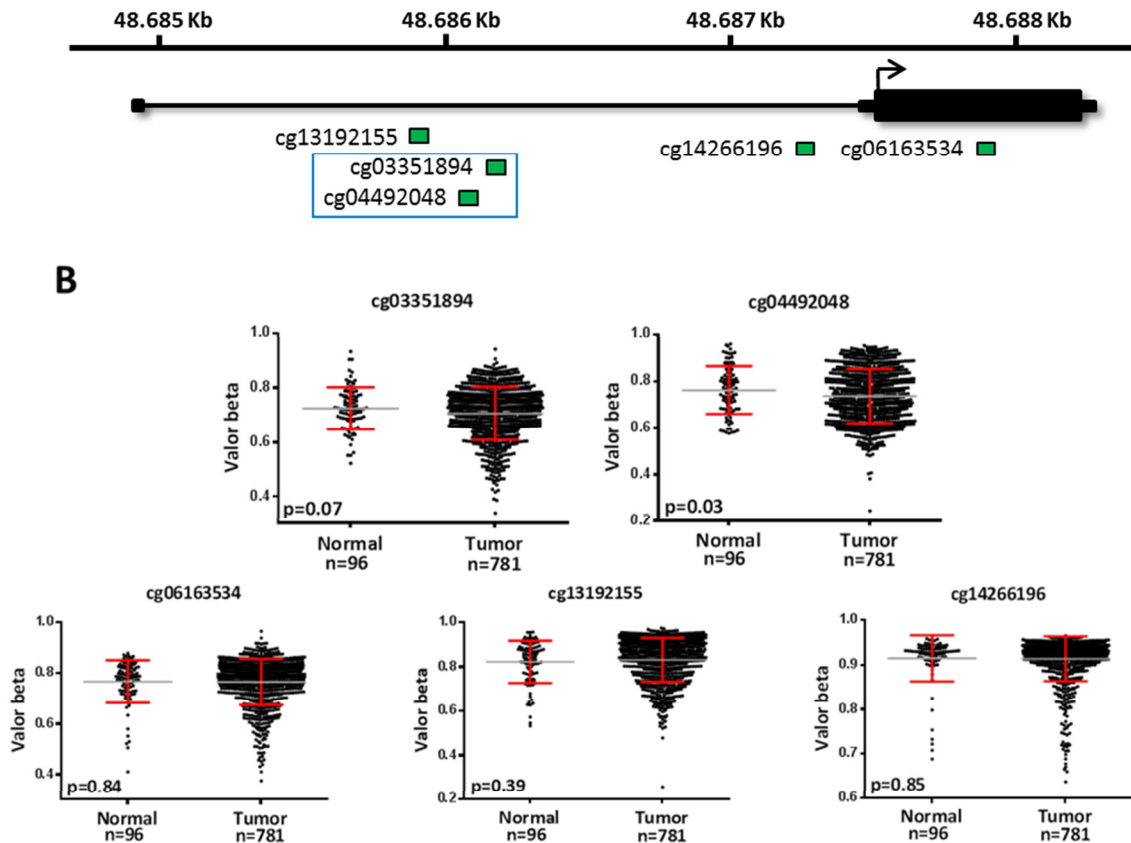
		p-valor
CDI PAM50	Basal vs Luminal A	<0,0001
	Basal vs Luminal B	<0,01
	Basal vs HER2	<0,05
Estatus ESR1	ESR1- vs ESR1+	<0,0001

**Tabla 11.** Diferencias estadísticas entre los valores medios de expresión de *ERAS* al comparar los subtipos de la firma PAM50 dentro de los carcinomas ductales invasivos (CDI PAM50) y el estatus del receptor de estrógenos.

### 3.5 La -expresión de *ERAS* en cáncer de mama podría estar mediada por alteraciones epigenéticas.

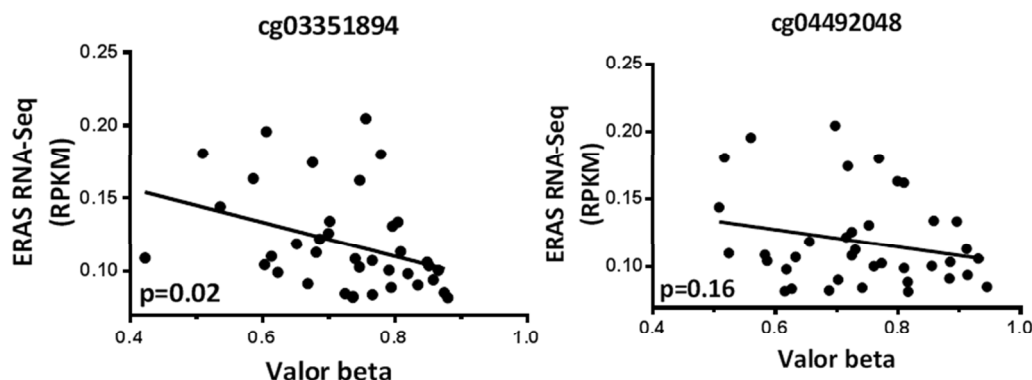
La metilación del ADN es una marca epigenética típicamente asociada con la represión de la transcripción génica. El gen *ERAS*, el cual está activo solo durante el desarrollo embrionario temprano, está inactivado en los organismos adultos mediante la metilación de islas CpG<sup>145–147</sup>. Con el objetivo de estudiar los posibles cambios en la metilación de regiones cercanas al gen *ERAS* en los tumores mamarios, analizamos los datos de expresión génica y metilación disponibles en la base de datos TCGA. Identificamos cinco regiones CpG específicas en el locus de *ERAS*, dos de las cuales presentaron una tendencia hacia la hipometilación en tumores cuando se compararon con muestras de tejido normal (cg03351894,  $p=0,07$  y cg04492048,  $p=0,03$ ). Ambas regiones CpG se localizan en el primer intrón del gen, muy próximas entre sí (**Figura 58**).

## A *ERAS*. Cromosoma X



**Figura 58. Análisis de la variación en la metilación en tumores mamarios humanos en las regiones CpG del locus *ERAS*.** A. Estructura del gen humano *ERAS*; se muestran las sondas usadas para estudiar las variaciones en la metilación (cuadrados verdes). Las dos sondas que presentan una tendencia hacia la hipometilación en los tumores cuando se comparan las muestras normales y tumorales (cg03351894 y cg04492048) se muestran dentro de un recuadro azul. B. Comparación de los valores-beta (indicativos del nivel de desmetilación) entre las muestras normales y tumorales para cada región CpG. Se muestran las medias  $\pm$  las desviaciones estándar.

Estudiamos la posible correlación entre la metilación en estas dos regiones y la expresión de *ERAS*. Cuando consideramos todos los tumores, no encontramos correlación entre los niveles de metilación y los de expresión. Sin embargo, cuando seleccionamos solo aquellos tumores con niveles de expresión superior al umbral establecido (valores superiores al valor medio de expresión de las muestras control más dos desviaciones estándar), los niveles de metilación de ambas regiones correlacionaron negativamente con los niveles de expresión de *ERAS*, siendo una de estas correlaciones estadísticamente significativa a pesar del bajo porcentaje de muestras con expresión de *ERAS* (cg03351894,  $p=0,02$ ; **Figura 59**). Estos datos sugieren que la activación de *ERAS* en tumores de mama humanos podría estar mediada por cambios en los procesos de metilación/desmetilación, en concordancia con el mecanismo de regulación transcripcional de *ERAS* descrito en otros tipos celulares.



**Figura 59. Correlación entre expresión de *ERAS* y nivel de metilación.** Las gráficas muestran la correlación entre los niveles de expresión de *ERAS* y el grado de metilación (en las dos regiones que presentan diferencias en la metilación en los tumores) en aquellos tumores con niveles de expresión superiores a 0,08 RPKM.

#### 4. -Ratones transgénicos K5-ERAS: un nuevo modelo para el estudio del cáncer de mama.

Tras obtener los resultados de las pruebas *in vitro*, *in vivo* y del estudio de las muestras humanas mostrados en los apartados anteriores, decidimos generar líneas de ratones transgénicos que expresasen el gen *ERAS* en células epiteliales y mioepiteliales con el objetivo de establecer un nuevo modelo que permita estudiar la implicación de *ERAS* en el cáncer de mama, así como en otros tumores de origen epitelial. Para ello, empleamos el promotor de la queratina K5, capaz de dirigir la expresión de transgenes a las células basales de epitelios estratificados y a las células mioepiteliales de glándulas exocrinas<sup>148</sup>. Para generar los ratones transgénicos K5-ERAS clonamos el gen humano *ERAS* (con el epítipo HA en su extremo 5') dentro de un vector de expresión que contiene un fragmento de 5,2 kbp de la región 5' del gen de la queratina K5 bovina, el intrón 2 del gen de la beta-globina del conejo y una señal de poliadenilación. Este fragmento de ADN K5-ERAS de 7,7 kbp (**Figura 60**) fue microinyectado en uno de los pronúcleos de óvulos de ratón recién fecundados de fondo genético B6D2-F2. Tras las microinyecciones, trasplantamos los embriones al infundíbulo de hembras receptoras, obteniendo posteriormente entre la descendencia cuatro animales transgénicos fundadores, hembras en su totalidad. A partir del cruce de estas hembras fundadoras con machos B6D2-F1 se generaron 3 líneas de ratones transgénicos denominadas B6D2-Tg(KRT5-ERAS)1Armz, B6D2-Tg(KRT5-ERAS)2Armz y B6D2-Tg(KRT5-ERAS)3Armz, a las cuales nos referiremos a partir de ahora como K5-ERAS L1, L2 y L3, respectivamente. La cuarta hembra fundadora, que presentaba un fenotipo más severo (ver más adelante), solo generó un descendiente



transgénico que no sobrevivió al destete, por lo que no pudimos derivar una línea a partir de ella. Además, obtuvimos otro ratón fundador que murió el mismo día de su nacimiento.

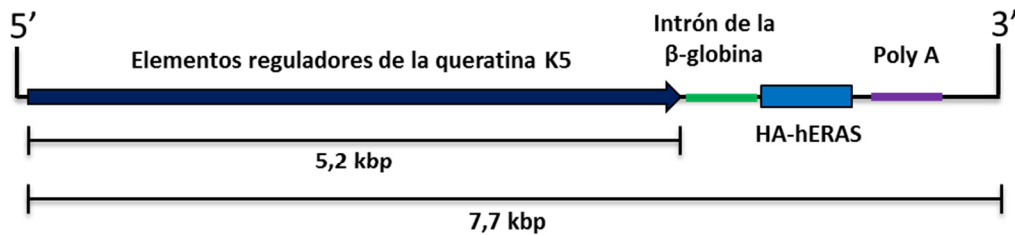


Figura 60. Representación del transgén K5-ERAS.

#### 4.1 Análisis del número de copias de las líneas de ratones transgénicos K5-ERAS.

Para caracterizar genéticamente las diferentes líneas de ratones K5-ERAS empleamos dos técnicas complementarias: el southern blot y la PCR cuantitativa a partir de ADN, con la intención de determinar el número de copias del transgén y su estructura. Para ello, seleccionamos 2 animales de cada línea y un animal control. Para llevar a cabo el southern blot, extrajimos el ADN genómico de estos animales a partir de una muestra de la cola y lo digerimos con dos enzimas de restricción, EcoRI y PstI, de forma independiente. Los sitios de restricción EcoRI y PstI presentes en el transgén y el consecuente patrón de digestión esperado al digerir con estas enzimas se esquematizan en la **figura 61**.

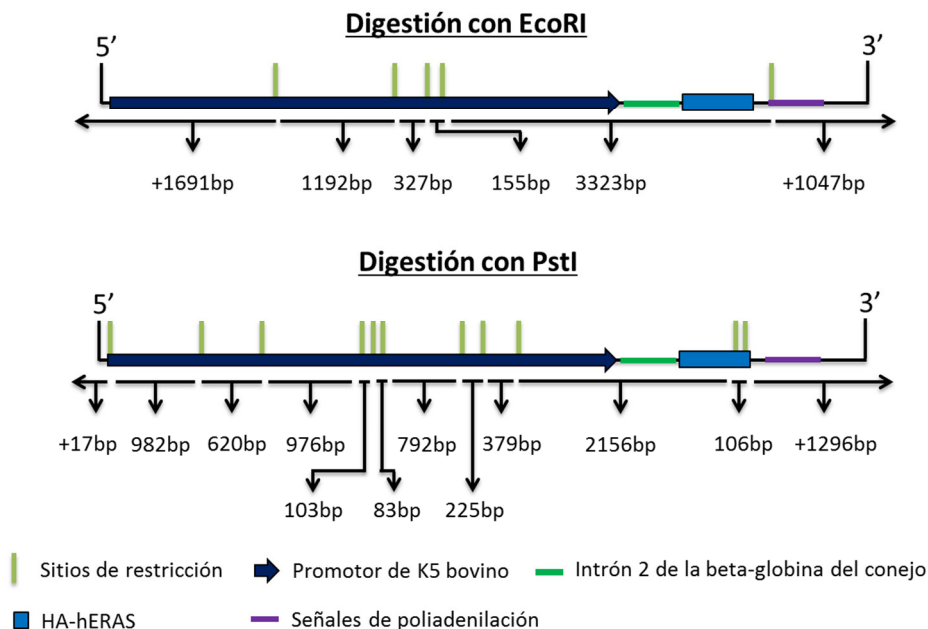
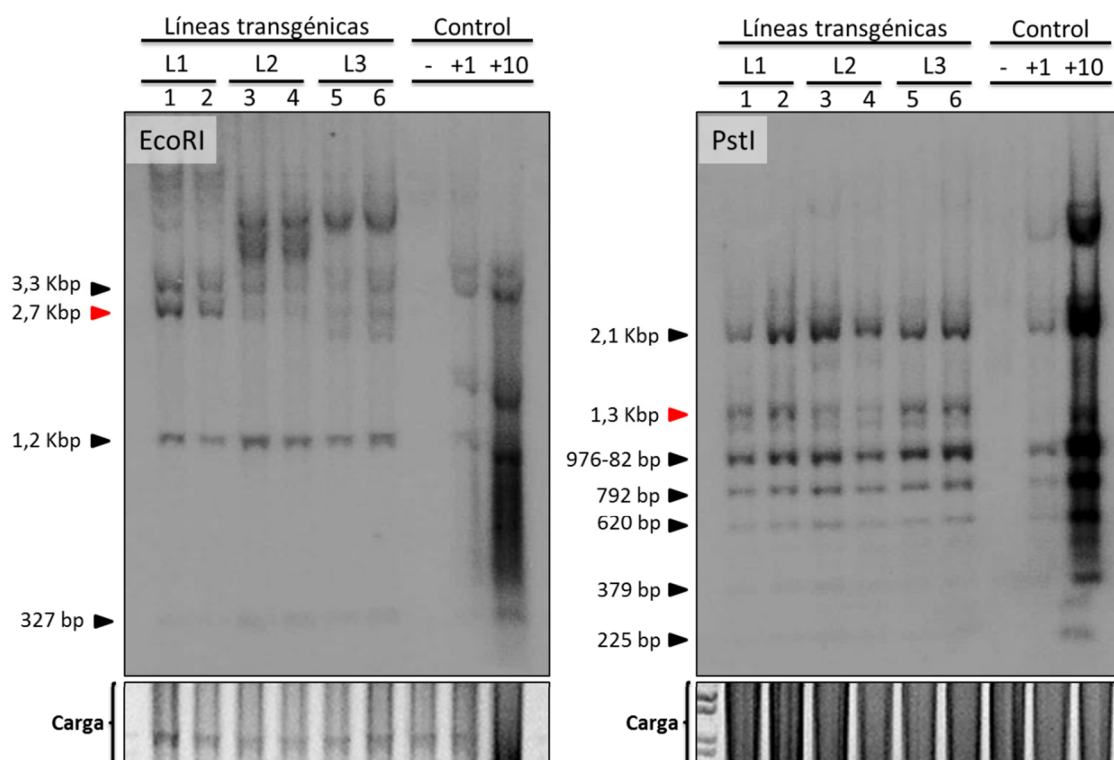


Figura 61. Sitios de restricción EcoRI y PstI en el transgén K5-ERAS. Esquema del transgén K5-ERAS en el que se muestran los sitios de restricción de las enzimas EcoRI y PstI y los tamaños de los fragmentos de ADN generados tras su digestión.

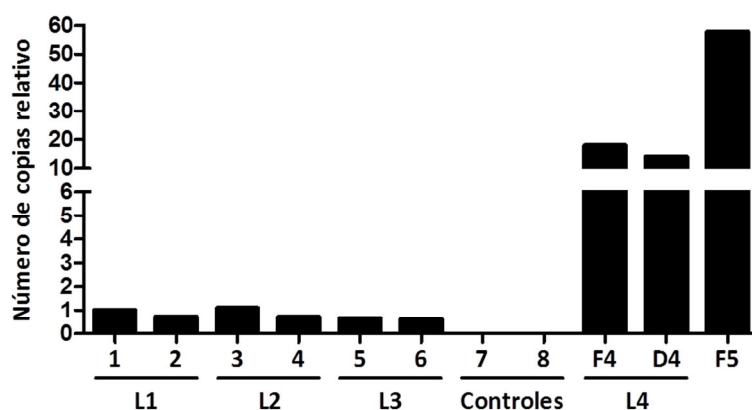
El southern blot mostró que las tres líneas de ratones transgénicos K5-ERAS presentan un número de copias similar entre sí, estimándose que portan entre 2 y 4 copias del transgén. Además, se confirmaron los patrones de digestión esperados del transgén, indicando la ausencia de grandes anomalías en su conformación tras su integración. Tanto en la digestión de EcoRI como en la de PstI, se observó una banda adicional en las tres líneas de ratones transgénicos que corresponde al fragmento formado por la unión de los fragmentos terminales 3' y 5' de copias sucesivas del transgén; de estos datos concluimos que todas las líneas presentan más de una copia del transgén y que, al menos dos de las copias se encuentran unidas en tándem por los extremos 3' y 5' (**Figura 62**).



**Figura 62. Southern blot de las distintas líneas transgénicas K5-ERAS.** Se muestran los southern blots correspondientes a las digestiones con EcoRI (izquierda) y PstI (derecha). Cada línea de animales transgénicos está representada por dos hermanos de camada. Los carriles correspondientes a 1 y 10 copias del transgén se simularon añadiendo la cantidad correspondiente de plásmido K5-ERAS al ADN de un animal no transgénico. Los triángulos negros indican las bandas internas del transgén, mientras que los triángulos rojos indican el fragmento correspondiente a la unión 3'-5' del transgén. En la parte inferior se muestra un fragmento de los geles de agarosa, en los que se aprecia que la carga es similar en las muestras analizadas.

Por otro lado, analizamos el número de copias relativo del transgén mediante PCR cuantitativa en las 3 líneas de ratones transgénicos empleando los mismos animales que usamos para realizar el southern blot, confirmando que portan un número de copias semejante entre sí. Asimismo, analizamos el número de copias relativo de la cuarta hembra fundadora (F4) y su único descendiente (D4), así como las copias relativas del fundador que murió con un día de edad (F5). Este último nació con los ojos abiertos, sugiriendo que el nivel

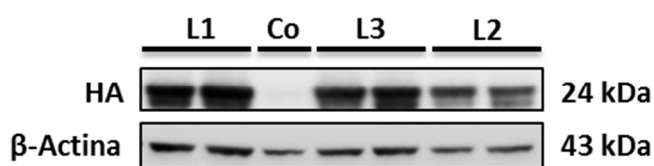
de expresión fuera elevado (en la experiencia de nuestro laboratorio es relativamente frecuente que transgenes dirigidos por el promotor de K5 causen problemas en la apertura de los párpados). Verificamos que los ratones de las líneas L1, L2 y L3 eran portadores de un número de copias bastante parecido, y determinamos que los animales de la línea L4 y el fundador F5 portaban, respectivamente, un número de copias entre 15 y 55 veces mayor (Figura 63). La concurrencia entre estos números de copias elevados en L4 y F5 y su baja viabilidad sugiere que la expresión elevada de ERAS es deletérea, dando lugar a problemas de fertilidad y mortalidad prematura.



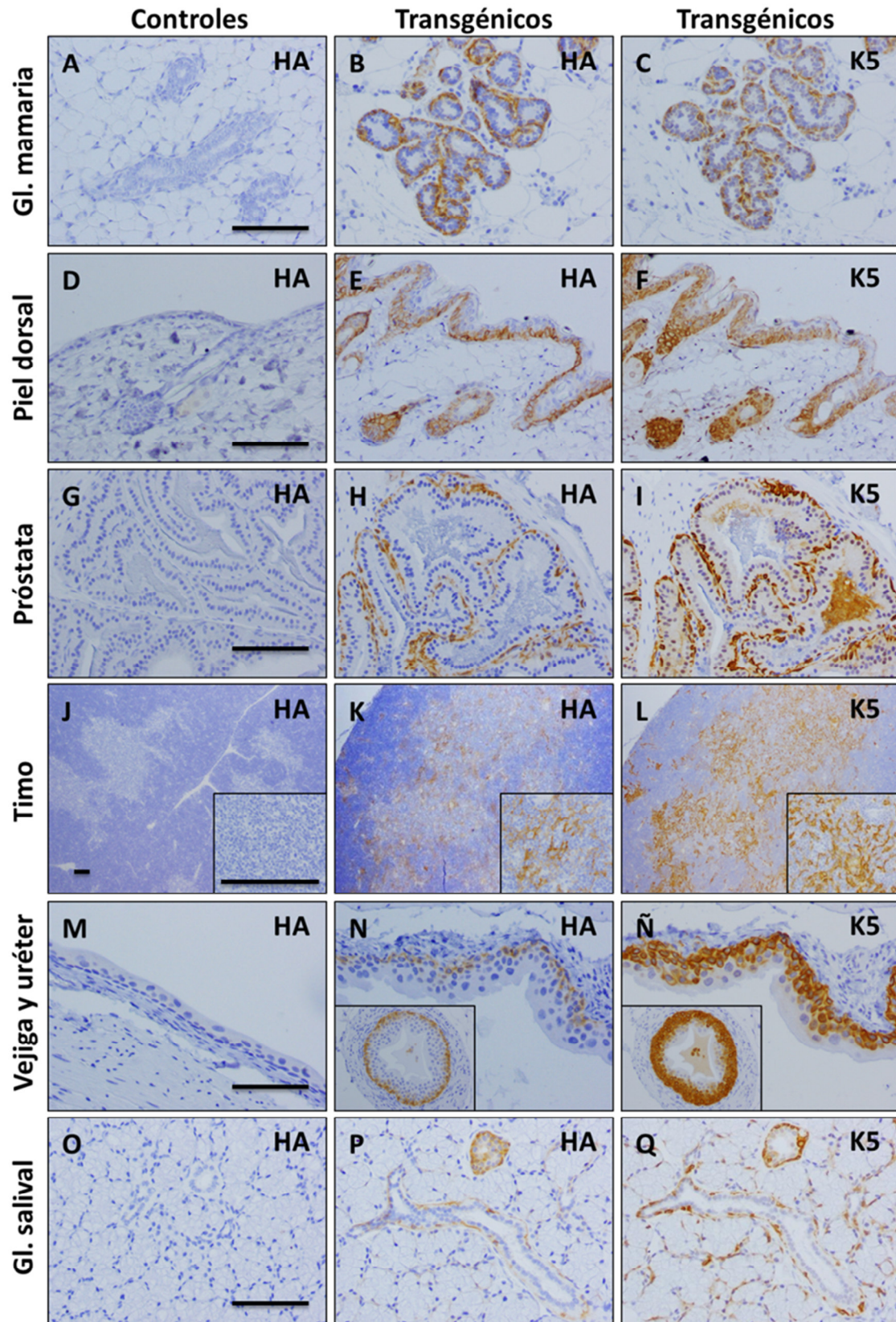
**Figura 63. Cuantificación relativa del número de copias del transgén K5-ERAS.** Comparación del número de copias del transgén K5-ERAS entre miembros de las líneas L1, L2 y L3. Las muestras marcadas como L4 corresponden a la cuarta hembra fundadora (F4) y su único descendiente transgénico (D4). F5 corresponde al quinto animal fundador. El número de copias se normalizó respecto al gen de la titina (*Ttn*) de ratón.

#### 4.2 Análisis de la expresión de ERAS en las líneas de ratones transgénicos K5-ERAS.

Con el objetivo de caracterizar el patrón de expresión del transgén en los ratones K5-ERAS, llevamos a cabo el análisis de su expresión proteica mediante western blot e inmunohistoquímica. Para llevar a cabo esta comparación mediante western blot, empleamos la piel del lomo de dos hermanos de camada de cada línea. No empleamos la glándula mamaria, dado que el porcentaje de células positivas para la queratina K5 en la mama de una hembra virgen es muy reducido. A través del análisis por western blot observamos que las 3 líneas de ratones transgénicos presentaba unos niveles similares de expresión del transgén. (Figura 64).



**Figura 64. Western blot donde se muestran los niveles de expresión del transgén en la piel de las 3 líneas de animales transgénicos.** Se emplearon dos hermanos de camada de cada línea y un hermano control (Co).

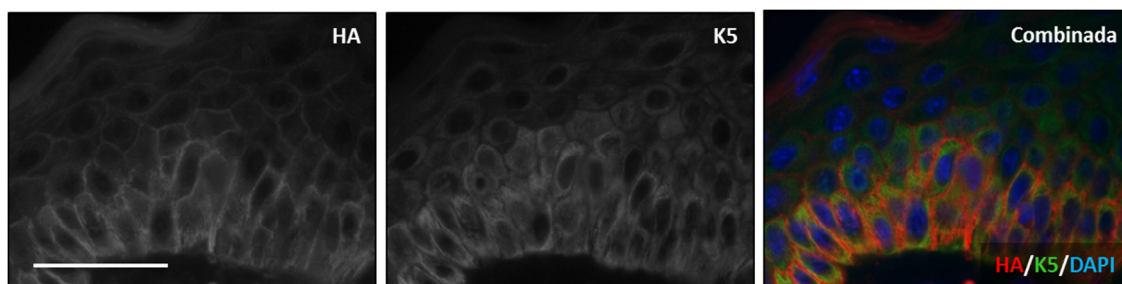


**Figura 65. Expresión del transgén en diferentes tejidos de los ratones K5-ERAS.** Inmunohistoquímicas representativas del epítipo HA y la queratina K5 de animales controles y animales transgénicos en: A, B, C la glándula mamaria; D,E,F. la piel; G, H, I. la próstata; J,K,L. el timo (los recuadros corresponden a una sección de la médula a mayores aumentos); M, N, Ñ. la vejiga (los recuadros muestran un uréter); y O, P,Q. la glándula salival sublingual. Las barras representan 100  $\mu\text{m}$ .



Asimismo, analizamos la expresión de ERAS en la glándula mamaria, la piel y otros tejidos que expresan la queratina K5 (como el epitelio oral, las glándulas salivales, el timo, la próstata y la vejiga, entre otros) mediante inmunohistoquímica, usando un anticuerpo específico contra el epítipo HA. Como cabía esperar, ERAS se expresó en las capas basales de los epitelios estratificados y en las células mioepiteliales de glándulas exocrinas, como la glándula mamaria, coincidiendo su tinción con la de la queratina K5 (**Figura 65A-65Q**).

Mediante inmunofluorescencia, confirmamos que ERAS se localiza principalmente en la membrana plasmática de las células positivas para la queratina K5 en los ratones transgénicos, acompañado de una leve tinción citoplasmática (**Figura 66**). Además, no observamos diferencias en los niveles de tinción y la localización de ERAS entre las 3 líneas de ratones transgénicos; este resultado sugiere que ERAS es funcional en las células epiteliales de los animales transgénicos.

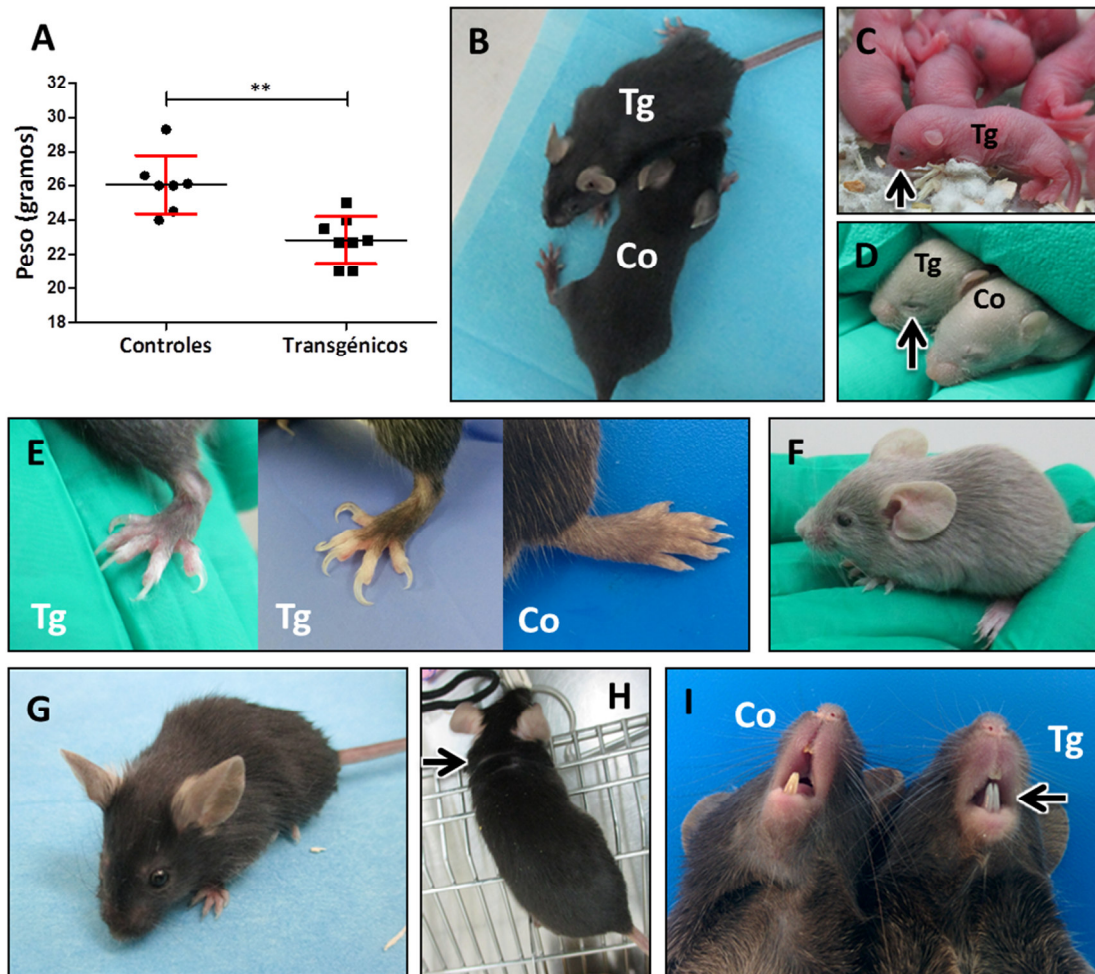


**Figura 66. Localización celular de ERAS en los animales K5-ERAS.** Inmunofluorescencia representativa del epítipo HA y la queratina K5 en la piel de un animal transgénico. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1 Descripción del fenotipo de los ratones K5-ERAS.

Las tres líneas de ratones transgénicos K5-ERAS muestran un fenotipo externo que resulta evidente en la mayoría de los animales a partir de las 2-3 semanas de edad; aunque los ejemplos que se muestran en los apartados 4.3 y 4.4 corresponden a la línea L1 (salvo que se indique lo contrario) por ser la que se generó antes, este fenotipo es similar en las tres líneas. En general, estos animales son de menor tamaño y peso que sus hermanos de camada control a lo largo de toda su vida ( $p < 0,01$ ; **Figura 67A y 67B**). Además, los ratones K5-ERAS presentan otra serie de características fenotípicas externas generales: a) apertura prematura de los párpados en ocasiones, con inflamación y exceso de mucosidad pasajera en el momento del destete (**Figura 67C y 67D**); b) hiperproliferación y malformación de las uñas (onicogriposis) (**Figura 67E**); c) aumento del tamaño de las orejas (**Figura 67F**); d) alteraciones en el manto piloso, con mayor abundancia de pelos que, a su vez, son de mayor longitud (**Figura 67G y 67H**); e) incisivos de color blanquecino en comparación con el color marrón-amarillento que presentan los ratones control (**Figura 67I**); f) cambios regionales (principalmente en las zonas caudales) en la coloración del manto piloso, adquiriendo tonos cobrizos con la edad e

independientemente del color de la capa del animal. Por otro lado, también pudimos observar cambios en el comportamiento de los ratones transgénicos, siendo animales más dóciles y menos agresivos que los ratones control.

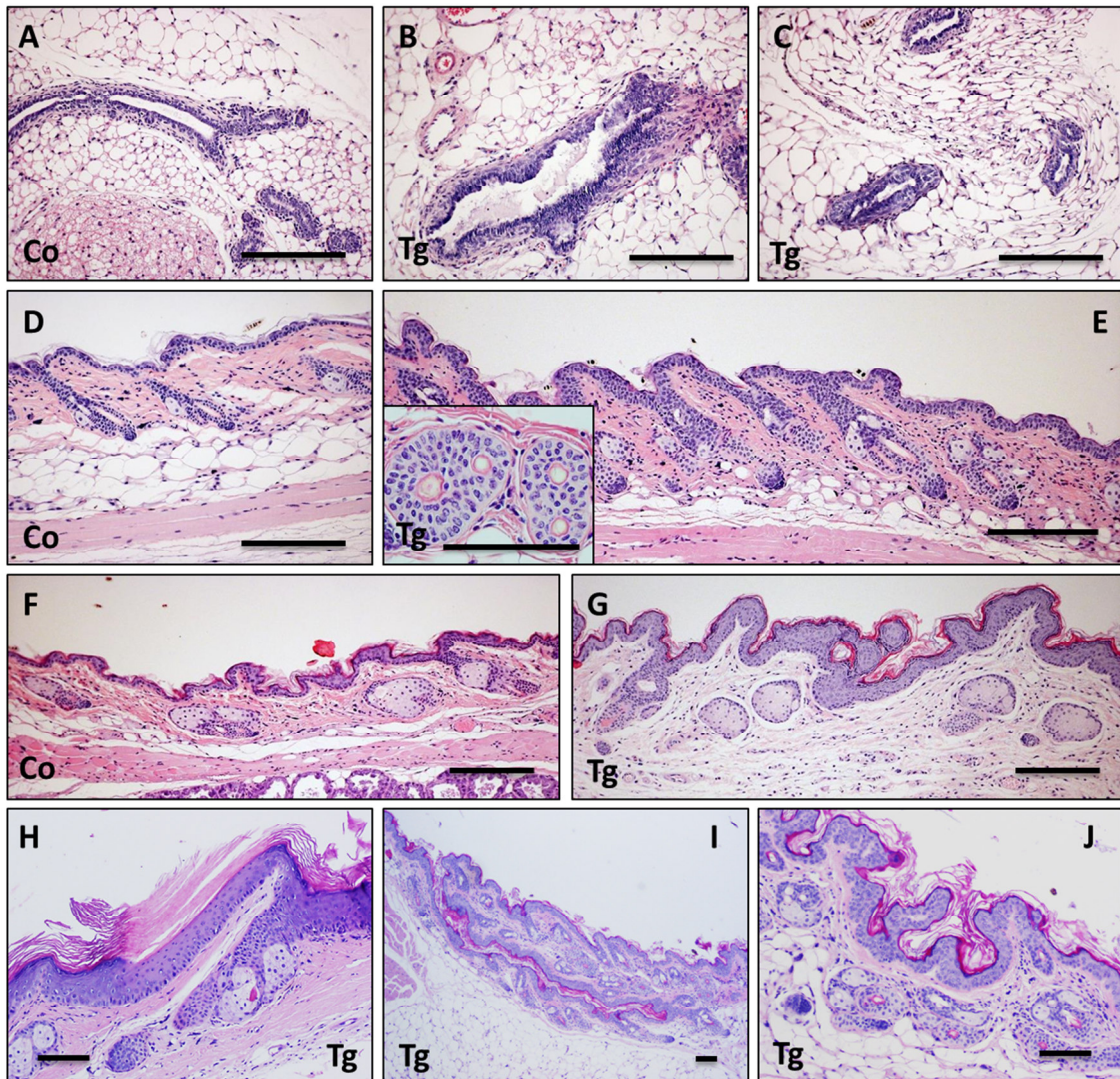


**Figura 67. Fenotipo de los ratones K5-ERAS.** A. Gráfica representativa de la diferencia de peso de los ratones transgénicos respecto a los ratones control. Se compararon 8 machos de 60 días de edad de cada genotipo. Se muestran las medias  $\pm$  las desviaciones estándar.  $**p < 0,01$ . B. Imagen de un ratón transgénico y un ratón control de la misma edad donde se observa la diferencia de tamaño. C y D. Imágenes donde se observa la apertura prematura de los ojos (flechas) en los ratones transgénicos. La imagen C corresponde al fundador 5 en el día de su nacimiento. E. Imágenes de las uñas de dos animales transgénicos y un animal control. F. La imagen corresponde la fundadora 4; se observa el gran tamaño de las orejas y el aumento en la longitud de las uñas. G y H. Imágenes que muestran las alteraciones del manto piloso, con un pelo abundante, largo, sin brillo y con la formación de pliegues en la región cervical (flecha). I. La imagen muestra el color de los incisivos en un ratón control y en un ratón transgénico. Co = control; Tg = transgénico.

Con el objetivo de caracterizar en mayor profundidad el efecto de la expresión de ERAS, evaluamos las alteraciones de diferentes tejidos a nivel histológico. La glándula mamaria de las hembras K5-ERAS muestra una hiperplasia y displasia del epitelio ductal, con marcada atipia y células suprabasales de núcleos grandes (**Figura 68A-68C**). La piel de los ratones transgénicos presenta una marcada y uniforme hiperplasia epidérmica, caracterizada por un mayor número de capas en el estrato espinoso (acantosis), un aumento de la capa córnea (hiperqueratosis) e,



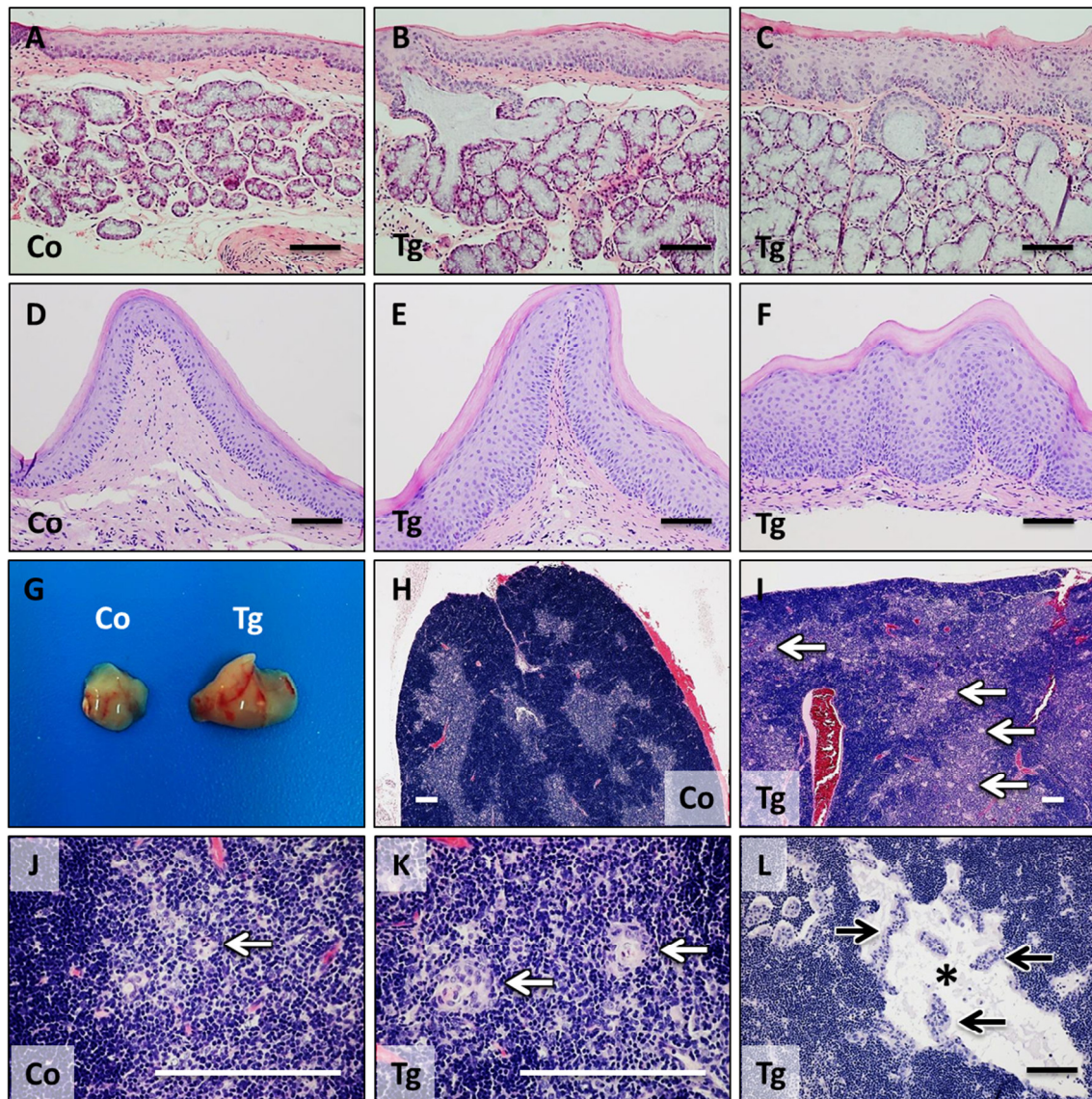
incluso, presencia de células córneas anormales con persistencia de los núcleos (paraqueratosis). En la piel también se puede observar una hiperplasia de los folículos pilosos (los cuales tienden a formar parejas) y una discreta hiperplasia de las glándulas sebáceas asociadas a los folículos (**Figura 68D-68G**). Del mismo modo, la piel de la cola y de las orejas presenta una fuerte hiperplasia, observándose un aumento de los pliegues cutáneos en el pabellón auditivo debido a la excesiva proliferación de la piel (**Figura 68H-68J**).



**Figura 68. Fenotipo histológico de la glándula mamaria y la piel en los ratones K5-ERAS. Tinciones hematoxilina-eosina.** A-C. Conducto y acinos mamarios de una hembra control (A) y una hembra K5-ERAS (B y C), donde se muestra la hiperplasia y la displasia de las células epiteliales. Las imágenes son de hembras vírgenes de 65 días de edad. D-E. Piel del lomo de un animal control (D) y un animal transgénico (E). En la imagen E se observa la marcada hiperplasia de la epidermis y los folículos pilosos. El recuadro muestra folículos pilosos formando parejas. F y G. Piel ventral de un ratón control (F) y de un ratón K5-ERAS (G). En la imagen G se observa la hiperplasia de la epidermis, así como hiperqueratosis y paraqueratosis. También se puede ver la hiperplasia de las glándulas sebáceas. H. Piel de la cola de un animal transgénico con hiperplasia de la epidermis e hiperqueratosis. I y J. Piel de la oreja de un animal transgénico. En la imagen I se observa un gran pliegue cutáneo. En la imagen J se muestra la hiperplasia del epitelio, formando “pseudovellosidades”. Co = animal control; Tg = animal transgénico. Las barras representan 100 µm.



También pudimos observar una evidente hiperplasia en todo el epitelio oral, siendo especialmente marcada en el epitelio del paladar, en el cual se observa no solo un aumento en el número de capas, sino también en el de crestas palatinas (**Figura 69A-69F**).

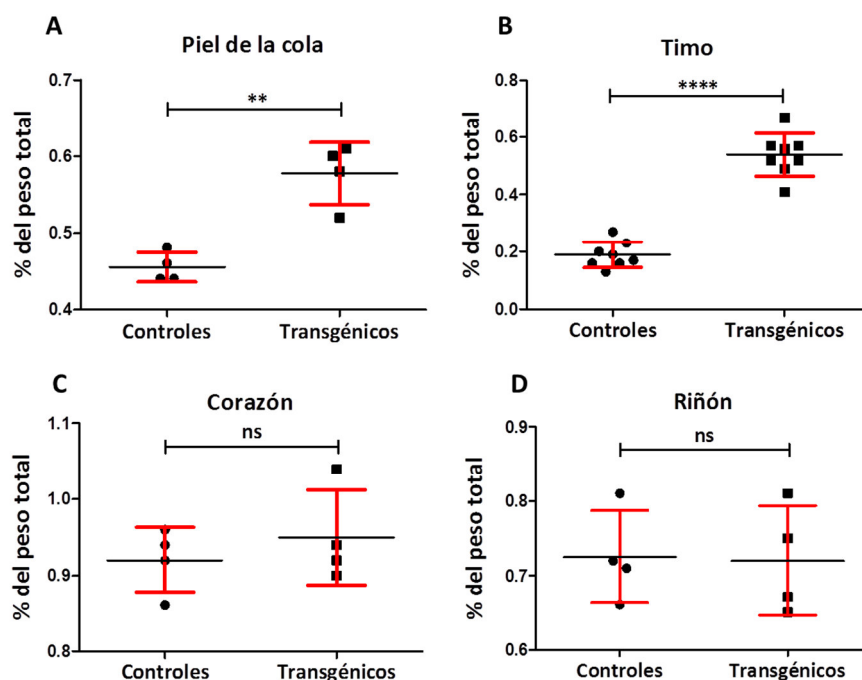


**Figura 69. Fenotipo histológico del epitelio oral y el timo de los ratones K5-ERAS. Tinciones hematoxilina-eosina.** A-C. Epitelio del paladar blando y glándulas salivales adyacentes de un animal control (A) y de ratones K5-ERAS (B y C) a las 6 semanas de edad. Se observa la hiperplasia epitelial y la hiperqueratosis. D-F. Epitelio de la segunda cresta palatina del paladar duro de un animal control de 60 días (D) y de hermanos de camada transgénicos (E-F). Se observa la hiperplasia epitelial, junto con hiperqueratosis y paraqueratosis. Además, se observa en casos un aumento aberrante del número de crestas palatinas (F). G. Imagen macroscópica del timo de un animal control y un animal transgénico de la misma edad. H-I. Histología del timo de un animal control (H) y de un animal transgénico (I). En la imagen I se observa una mayor proporción de la médula tímica y un mayor número de acúmulo de células linfopiteliales (flechas). J-K. Detalle de la médula tímica de un animal control (J) y de un animal transgénico. Se muestran los acúmulos de células linfopiteliales (corpúsculos de Hassall) (flechas). L. Quiste medular (asterisco) tapizado por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado (flechas). Co = animal control; Tg = animal transgénico. Las barras representan 100 µm.

Además, observamos un aumento del tamaño del timo de los ratones transgénicos con respecto a los animales control (**Figura 69G**). Histológicamente, los timos de los ratones K5-ERAS presentan una expansión de la región medular, invirtiéndose en muchos casos la relación corteza : médula (pasando de la relación 2 - 2,5 : 1 habitual en un ratón control a 1 : 1 o incluso 1 : 2 en los ratones K5-ERAS) (**Figura 69H y 69I**). Esta observación podría explicarse por una hiperproliferación de las células epiteliales de la médula tímica a causa de la expresión del transgén, puesto que estas células expresan la queratina K5. Por otro lado, los timos de los ratones K5-ERAS mostraron un aumento en el número de quistes medulares (tapizados de un epitelio cilíndrico pseudoestratificado) y un aumento de acúmulos de células linfoepiteliales, que pueden dar lugar a corpúsculos de Hassall (normalmente muy pequeños o ausentes en la médula tímica de los ratones) (**Figura 69J-69L**). Curiosamente, el aumento del número de quistes medulares y corpúsculos de Hassall se relaciona con el envejecimiento prematuro de este órgano.

Por otro lado, observamos una ligera hiperplasia de la vejiga y los uréteres, pero no hallamos alteraciones evidentes y generalizadas en otros órganos como la próstata, el esófago o las glándulas salivales. Este hecho podría deberse a una menor expresión del transgén en estos tejidos o a una menor susceptibilidad de estos tipos celulares a la señalización mediada por ERAS. Por ello, resultaría interesante llevar a cabo un estudio más detallado del efecto de la expresión de ERAS en otros tejidos.

Con el objetivo de verificar el aumento del tamaño de la piel y el timo en estos ratones, comparamos el peso de una sección de 4 centímetros de piel de la cola de animales transgénicos y animales control, al igual que el peso de los timos. Tras calcular el porcentaje de ambos tejidos respecto al peso del animal, observamos que en ambos casos existían diferencias significativas ( $p < 0,01$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente; **Figura 70A y 70B**), mientras que en otros órganos, como los riñones o el corazón, no observamos estas diferencias (**Figura 70C y 70D**).



**Figura 70. Porcentaje relativo al peso corporal de:** A. la piel de la cola (4 cm desde la base); B. el timo; C. el corazón; y D. el riñón derecho. Comparamos dichos porcentajes entre animales control y transgénicos. Se muestran las medias  $\pm$  las desviaciones estándar. Para llevar a cabo la comparación se emplearon animales machos de 60 días de edad. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; ns = no significativo.

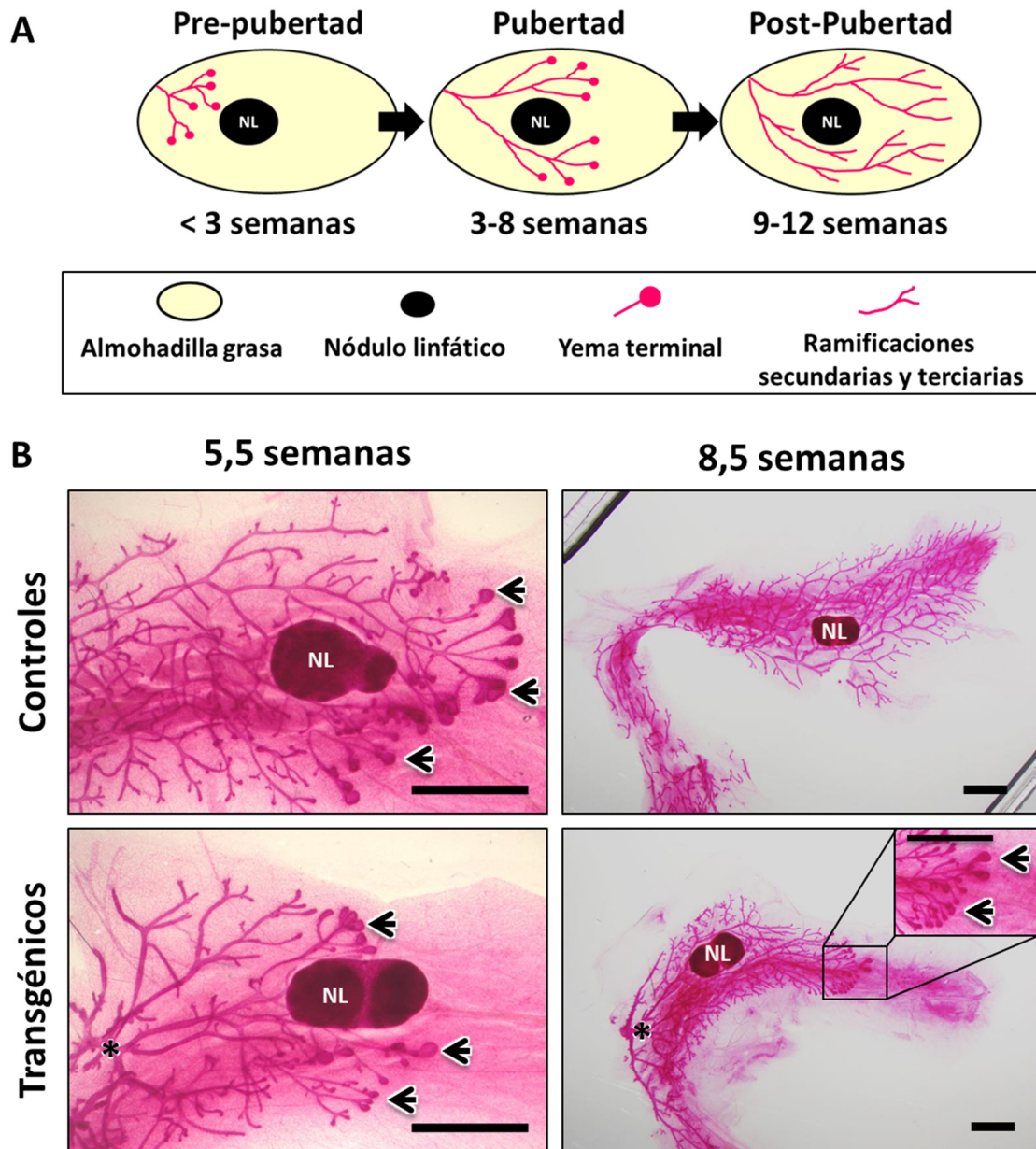
De forma general, todos estos datos indican que la expresión de ERAS, bajo el control de los elementos reguladores de la queratina K5, genera la hiperplasia y el crecimiento excesivo de algunos epitelios estratificados (como la piel o el epitelio oral) y glándulas exocrinas (como la glándula mamaria), además de otras alteraciones histológicas. Estos resultados confirman, al menos en parte, nuestros estudios *in vitro*, donde observamos que ERAS promueve la proliferación, tanto de las células epiteliales normales como de las tumorales, pudiendo dar lugar a alteraciones morfológicas.

#### 4.2 Estudio del desarrollo de la glándula mamaria en los ratones K5-ERAS.

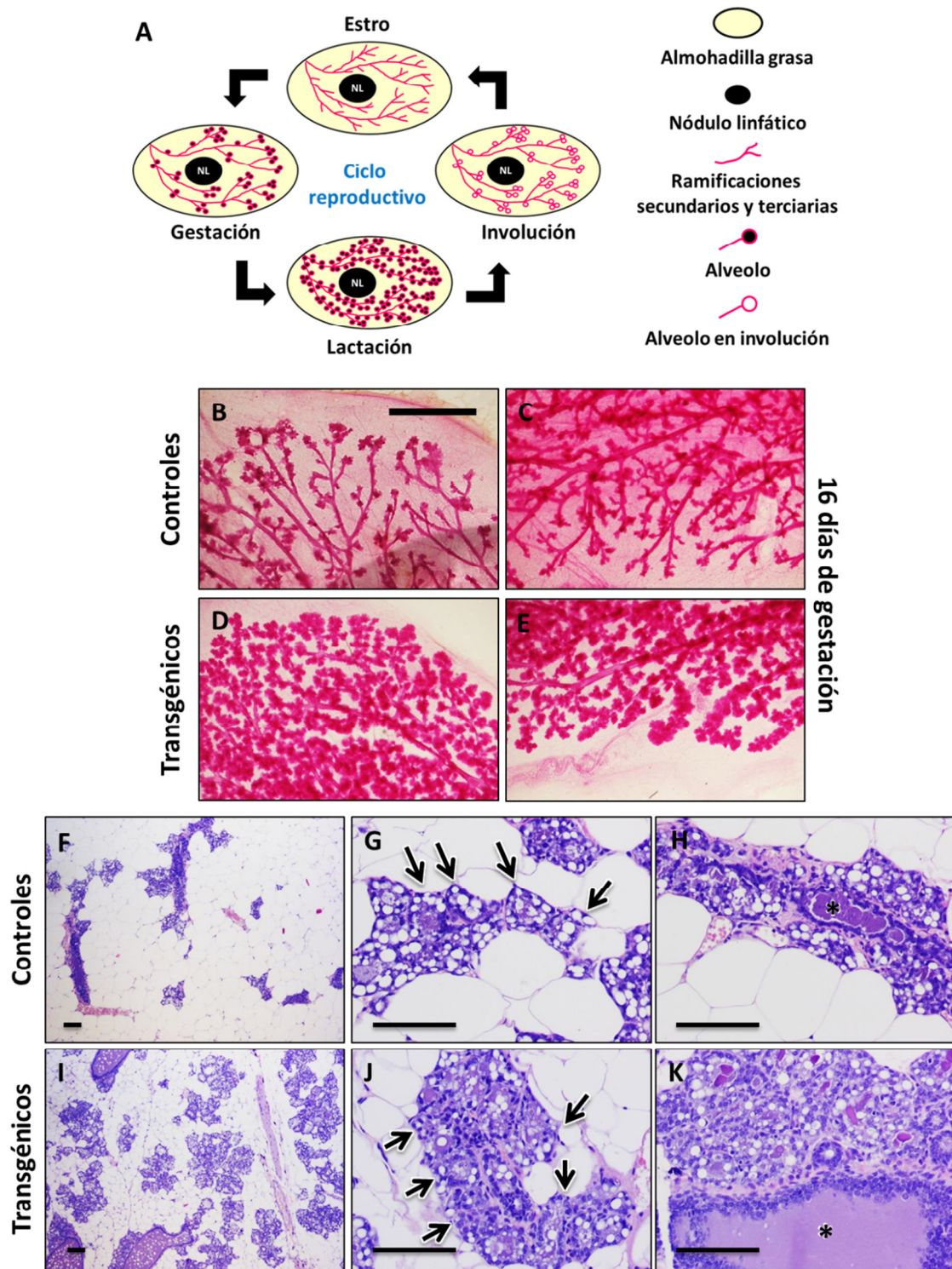
Con el fin de evaluar si la expresión de ERAS afecta al desarrollo de la glándula mamaria a lo largo de los diferentes estadios, estudiamos la arquitectura macroscópica e histológica del árbol ductal mamario en hembras vírgenes, gestantes y lactantes. Cuando comparamos el grado de desarrollo de la glándula mamaria en hembras vírgenes en el periodo de la pubertad (5,5 semanas), observamos un retraso en la expansión del epitelio mamario en los ratones transgénicos con respecto a los controles. Si tomamos como referencia la cuarta glándula mamaria, observamos que las yemas terminales sobrepasan el nódulo linfático en los ratones control, mientras que esto no ocurre en los ratones transgénicos (**Figura 71B**). Tras la pubertad (8,5 semanas), el epitelio mamario de los ratones control ha colonizado la almohadilla adiposa



de la glándula mamaria por completo y ya no se observan yemas terminales, indicando el fin de este estadio<sup>149</sup>. Sin embargo, el epitelio mamario de los ratones transgénicos no ha completado su expansión a esta edad, conservando aún las yemas terminales. No obstante, el árbol ductal de los ratones transgénicos presenta un mayor número de unidades ducto-lobulillares terminales y un ligero engrosamiento y dilatación de los conductos principales (Figura 71B).



**Figura 71. Desarrollo de la glándula mamaria en el estadio de la pubertad en ratones K5-ERAS.** A. Esquema de la expansión del epitelio mamario de la cuarta glándula mamaria en ratones desde el nacimiento hasta el final de la pubertad. B. Tinción carmín-alum de la cuarta glándula mamaria de ratones controles y transgénicos a las 5,5 y 8,5 semanas. Las flechas señalan algunas yemas terminales. Los asteriscos marcan la dilatación de los conductos principales en las glándulas mamarias de los animales transgénicos. NL = nódulo linfático. Las barras representan 2 mm.

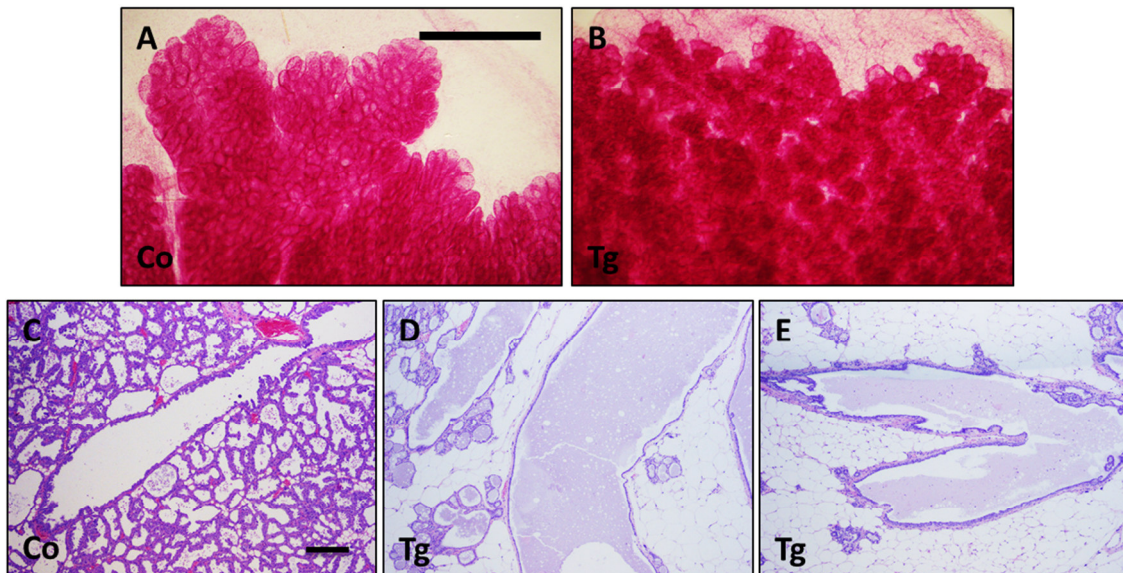


**Figura 72. Desarrollo de la glándula mamaria en el estadio de la gestación en ratones K5-ERAS. A.** Esquema de las modificaciones que experimenta el epitelio mamario en ratones durante el ciclo reproductivo. B-E. Tinción carmín-alum de la glándula mamaria de ratones controles (B y C) y transgénicos (D y E) a día 16 de gestación, observándose un mayor desarrollo acinar en los ratones transgénicos. La barra representa 2 mm. F-K. Histología de la glándula mamaria de ratones control (F-H) y ratones transgénicos (I-K) el día 16 de gestación. En los ratones transgénicos se observa un mayor número de acinos (flechas) y conductos de mayor tamaño e hiperplásicos (asteriscos). Las barras representan 100  $\mu$ m.



El estudio morfológico de la glándula mamaria de hembras gestantes (en el día 16 de gestación), determinó que las hembras transgénicas presentan un mayor desarrollo de la glándula, con un aumento en el número de acinos mamarios y un mayor diámetro de los conductos principales que las hembras control. Histológicamente también observamos un aumento en el número de acinos mamarios y la dilatación e hiperplasia de los conductos en los animales transgénicos (**Figura 72**).

Sin embargo, las hembras K5-ERAS tienen problemas de lactación, evidenciados por una alta mortalidad postparto de las camadas. Hemos observado que dentro del sistema ductal tiene lugar una estasis láctea, debida principalmente a obstrucciones generadas por la hiperproliferación del epitelio de los conductos y su queratinización, lo que dificulta el proceso de lactación e induce la involución temprana de la glándula. Este hecho ha impedido llevar a cabo un estudio en profundidad de la morfología de la glándula mamaria en hembras transgénicas lactantes e involutivas, dado que las glándulas presentan múltiples alteraciones que dificultan la determinación del estadio real de cada glándula de forma individual. A pesar de ello, en algunas hembras transgénicas pudimos observar que aquellas glándulas que estaban en producción láctea mostraban un mayor número de acinos que las hembras lactantes control. Sin embargo estos acinos mostraron un aspecto macizo, lo que sugiere que pueden estar colapsados por la excesiva proliferación epitelial, dando lugar a problemas funcionales (**Figura 73**).



**Figura 73. Desarrollo de la glándula mamaria en el estadio de la lactación en ratones K5-ERAS.** A-B. Tinción carmín-alum de la glándula mamaria de un ratón control (A) y uno transgénico (B) el día 13 de lactación, observándose un mayor desarrollo acinar en el ratón transgénico. La barra representa 2 mm. F-K. Histología de la glándula mamaria de un ratón control (C) y ratones transgénicos (D y E) el día 13 de lactación. En estos ratones transgénicos se observa la estasis láctea dentro de los conductos, los cuales están muy dilatados, dando lugar a la involución temprana de la glándula. Las barras representan 200  $\mu$ m. Co = control; Tg = transgénico.

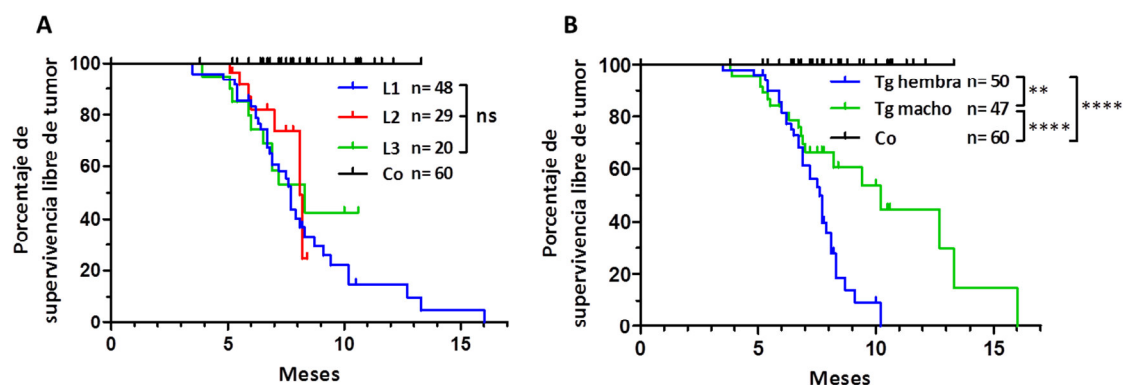


Por lo tanto, la expresión de ERAS en las células de la glándula mamaria que expresan la queratina K5 lleva a un retraso inicial en la expansión del epitelio mamario, acompañado de un ligero aumento en el número de UDLT y en el diámetro de los conductos principales. Sería interesante estudiar en más detalle la causa de este retraso en la colonización de la almohadilla adiposa inducido por ERAS, el cual podría deberse, por ejemplo, al menor tamaño de los animales transgénicos, lo que podría retrasar la pubertad, o a que la excesiva proliferación del número de capas de los conductos impide la correcta expansión del epitelio. Por otro lado, la expresión de ERAS en la glándula mamaria lleva a un crecimiento exacerbado del epitelio durante la gestación, aumentando el número de acinos mamarios y el diámetro de los conductos. Sin embargo, este crecimiento excesivo da lugar alteraciones en la lactación, impidiendo que la glándula lleve a cabo su función correctamente.

### **4.3 Estudio de los tumores espontáneos generados en los ratones K5-ERAS.**

#### **4.3.1 Monitorización y clasificación de los tumores espontáneos.**

Los ratones transgénicos K5-ERAS desarrollaron tumores epiteliales espontáneos, tales como tumores mamarios, cutáneos, orales o tímicos, entre otros; no se ha observado la aparición de tumores no epiteliales. Registramos la aparición de los tumores dos veces por semana en las tres líneas de animales transgénicos y comprobamos que todas ellas presentan la misma tendencia de aparición tumoral, no hallándose diferencias significativas en los periodos de supervivencia libre de tumor (**Figura 74A**). Sin embargo, cuando estratificamos la aparición de tumores de las tres líneas de ratones K5-ERAS en función del sexo de los animales, observamos que, aunque la tendencia inicial era la misma, a partir de los 7 meses de edad existían diferencias significativas entre hembras y machos ( $p < 0,01$ ). Las hembras transgénicas presentan una mediana de supervivencia libre de tumor de 7,6 meses, mientras que en los machos transgénicos esta mediana asciende a los 10,2 meses de edad (**Figura 74B**). Por lo tanto, podemos concluir que las tres líneas de animales transgénicos K5-ERAS son equivalentes en cuanto a sus periodos de aparición tumoral (de acuerdo a la similitud descrita en sus alteraciones fenotípicas y niveles de expresión) y que las hembras K5-ERAS desarrollan tumores epiteliales de aparición más temprana que los machos, debido a que un alto porcentaje desarrolló tumores mamarios (ver a continuación; **Tabla 12**).



**Figura 74. Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia libre de tumor de los ratones K5-ERAS, comparando:** A. las 3 líneas transgénicas y los animales control ( $p < 0,05$  cuando se comparan las 3 líneas transgénicas con los animales control); B. los animales transgénicos de las tres líneas separados por sexos y los controles. Las diferencias significativas se calcularon el con test Log-rank. Co = animales control; Tg = animales transgénicos; ns = no significativo; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

La clasificación y cuantificación de los tumores desarrollados en los ratones K5-ERAS reveló que el 54% de las hembras transgénicas desarrollaron tumores originados en la glándula mamaria. La mayoría de las hembras que desarrollaron tumores mamarios presentaban una alteración generalizada de la glándula mamaria con un elevado número de tumores por glándula y animal. Como consecuencia, la cuantificación absoluta del número de tumores mamarios no pudo llevarse a cabo. Con el objetivo de simplificar esta cuantificación, asignamos el valor “>10” a aquellas hembras que presentaban un número de tumores mamarios superior a esta cifra. Atendiendo a esta cuantificación relativa (que en realidad supone una subestimación del número real de tumores mamarios), el 86% de los tumores desarrollados en las hembras K5-ERAS fueron tumores de mama, estimándose un ratio promedio de al menos 5,4 tumores mamarios por hembra (**Tabla 12**).

El segundo tipo de tumor más frecuente desarrollado en los ratones K5-ERAS fue el de origen cutáneo (36%). Tanto hembras como machos desarrollaron tumores cutáneos en un porcentaje muy similar (34% (17 de 50) y 38% (18 de 47), respectivamente), siendo el ratio promedio de tumor cutáneo por animal de 1,2 en ambos sexos (**Tabla 12**). No todos los tipos de piel parecen igualmente sensibles a la transformación tumoral por ERAS, ya que, cuando estratificamos los tumores cutáneos según su lugar de aparición, observamos que un alto porcentaje (el 45%) se originó en la piel de la región de la cabeza, mientras que el resto de los tumores cutáneos se originaron en la piel del dorso (19%), en la piel de la región ventral (19%), así como en la piel de otras regiones anatómicas como la cola, las regiones axilares, la piel plantar y el escroto (17%).

Por otro lado, el 19% de los machos desarrollaron tumores en el epitelio oral, mientras que solo un 4% de las hembras presentaron este tipo tumoral ( $p = 0,0248$ ; test exacto de Fisher). El

100% de los tumores orales se originaron a partir del epitelio labial, no hallándose tumores orales en otras localizaciones (**Tabla 12**). Aunque todos los animales transgénicos analizados presentaban alteraciones en la estructura histológica del timo, solo 3 de ellos (dos hembras y un macho) desarrollaron tumores de origen epitelial tímico (timomas). Por último, tres machos transgénicos desarrollaron carcinomas en el epitelio de la glándula prepucial y otro macho transgénico presentó un carcinoma escamoso en el pene (**Tabla 12**). Como cabía esperar, no observamos grandes diferencias entre el porcentaje de tumores de cada tipo entre las diferentes líneas de animales transgénicos (**Anexo III**).

Estos resultados evidencian una mayor susceptibilidad de las células mamarias al desarrollo tumoral tras la expresión del gen *ERAS* que otras células que expresan la queratina K5. Además, la elevada tendencia al desarrollo de tumores mamarios en las hembras K5-ERAS justifica que presenten una mediana de supervivencia libre de tumor menor que los machos.

Ambos sexos n= 97	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	27	>145	27,8	>5,4	70,7
Tumores cutáneos	35	42	36,1	1,2	20,5
Tumores orales	11	11	11,3	1,0	5,4
Tumores tímicos	3	3	3,1	1,0	1,5
Otros	4	4	4,1	1,0	2,0
Total	52	>205	53,6	>3,9	100,0

Hembras n= 50	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	27	>145	54,0	>5,4	85,8
Tumores cutáneos	17	20	34,0	1,2	11,8
Tumores orales	2	2	4,0	1,0	1,2
Tumores tímicos	2	2	4,0	1,0	1,2
Otros	0	0	0,0	0,0	0,0
Total	33	>169	66,0	>5,1	100,0

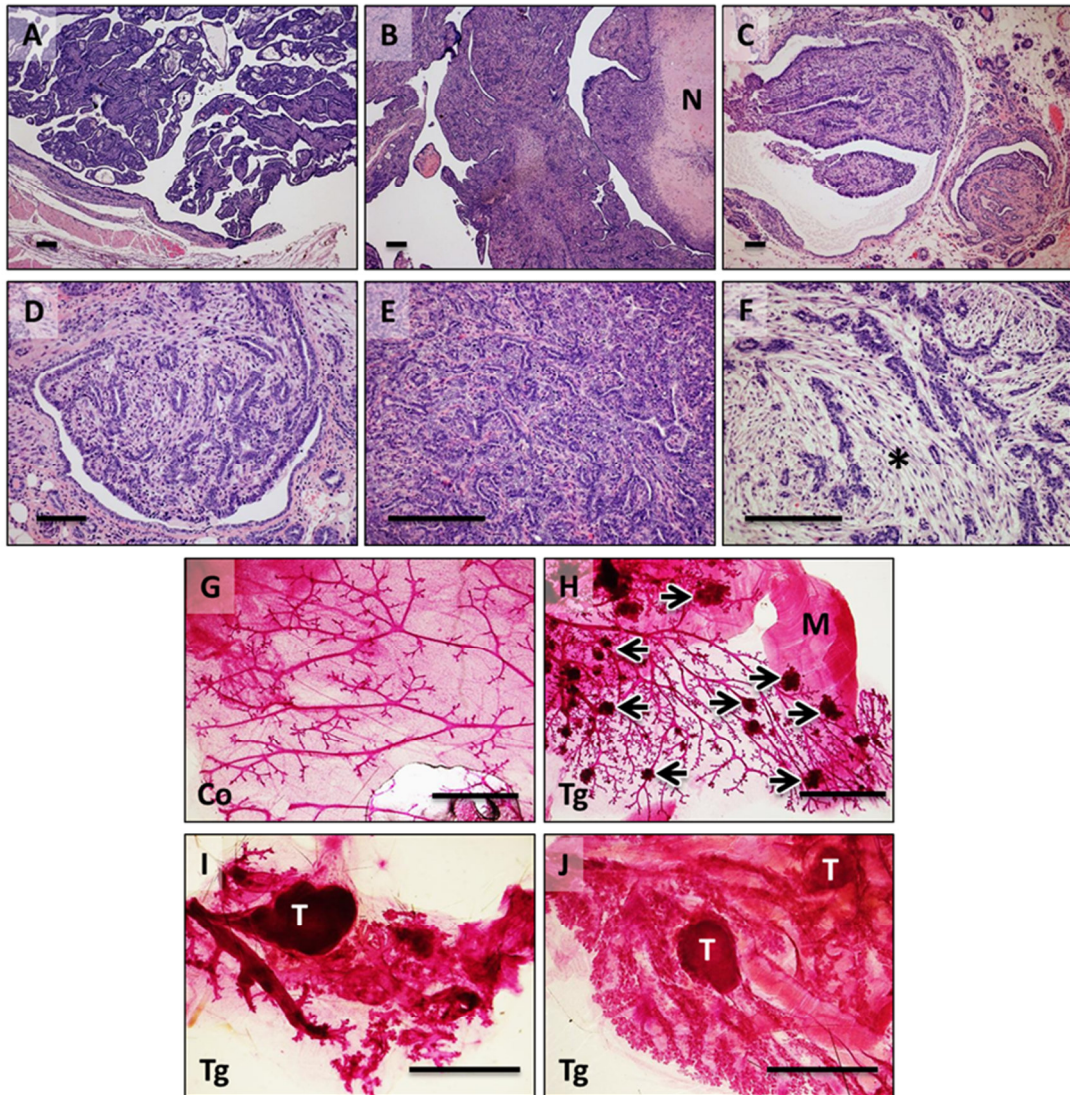
  

Machos n= 47	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	0	0	0,0	0	0,0
Tumores cutáneos	18	22	38,3	1,2	61,1
Tumores orales	9	9	19,1	1,0	25,0
Tumores tímicos	1	1	2,1	1,0	2,8
Otros	4	4	8,5	1,0	11,1
Total	19	36	40,4	1,9	100,0

**Tabla 12. Recuento del número de tumores epiteliales en las tres líneas de ratones K5-ERAS.** Se muestra el número de animales que desarrolló cada tipo tumoral, el número de tumores, así como el porcentaje de animales con tumor, el ratio tumor/animal y el porcentaje de cada tipo tumoral teniendo en cuenta ambos sexos a la vez y por separado. El número total de animales empleado en cada estudio se muestra en la casilla superior izquierda de cada tabla.

#### 4.3.2 Clasificación y caracterización histopatológica de los tumores mamarios.

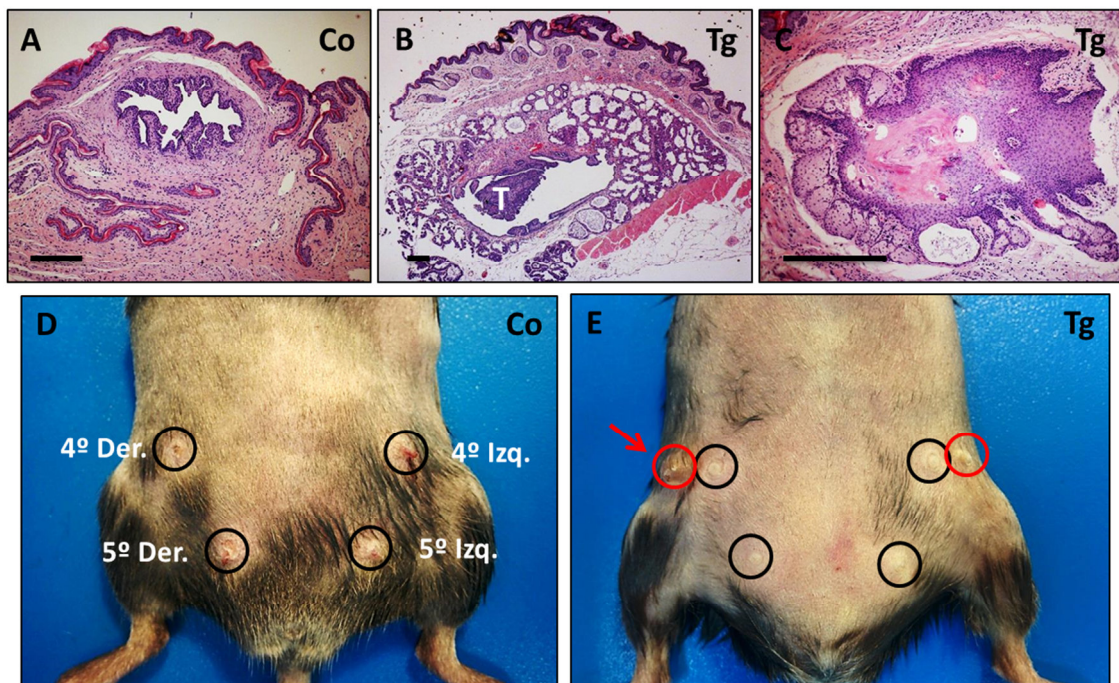
El análisis histopatológico de los tumores de mama generados en las tres líneas de ratones transgénicos K5-ERAS, mostró que todos ellos presentaban un patrón histológico muy similar. Como ya se ha comentado, estos ratones presentan hiperplasia y displasia de las células epiteliales y mioepiteliales de los conductos, dando lugar a múltiples carcinomas *in situ* que evolucionan a carcinomas invasivos. En general, los tumores mamarios generados por los ratones K5-ERAS se pueden clasificar como adenomioepiteliomas malignos.



**Figura 75. Tumores mamarios originados en los ratones K5-ERAS.** A-F. Histología de los tumores de mama. Tinción hematoxilina-eosina. A, B, C y D muestran diferentes tumores mamarios, observándose el patrón papilar-tubular, el crecimiento intraductal y la presencia de necrosis intratumoral (N). En las imágenes C, D y E se observa el crecimiento de células mioepiteliales. La imagen F muestra la hialinización del estroma (asterisco). Las barras representan 100  $\mu$ m. G-J. Tinción de la glándula mamaria completa con carmín-alum. G. Glándula mamaria de un animal control. H, I y J. Glándulas mamarias de animales transgénicos donde se observa la dilatación de los conductos mamarios y un amplio número de tumores. En la imagen H las flechas señalan algunos de los tumores. T = tumor. M = músculo escaleno. Las barras representan 2 mm.



Desde un punto de vista morfológico, estos tumores invasivos se caracterizan por presentar un patrón papilar-tubular y un crecimiento intraductal multicéntrico, con células epiteliales muy atípicas pero con poco pleomorfismo (**Figuras 75A-75J**). Este patrón se acompaña de un abundante crecimiento mioepitelial desorganizado y con diferentes grados de hialinización, rodeado por las células epiteliales (**Figuras 75E y 75F**). Además, en algunas ocasiones se pueden observar perlas de queratina, siendo siempre aisladas y minoritarias. Son tumores de crecimiento rápido, siendo común la presencia de necrosis por coagulación en el centro de los tumores de mayor tamaño, debido a la falta de aporte sanguíneo y la consiguiente isquemia (N en **Figura 75B**). Curiosamente, estos tumores presentan la misma morfología y características que los adenomioepiteliomas malignos humanos, un tipo tumoral considerado raro.



**Figura 76. Alteraciones en los pezones de las hembras K5-ERAS.** A. Imagen histológica del pezón de una hembra control. B. Canal del pezón de una hembra transgénica con un crecimiento tumoral en su interior (T). C. Pezón de una hembra transgénica con un adenocarcinoma sebáceo obstruyendo todo el canal. Las barras representan 100  $\mu$ m. D y E. Los círculos negros señalan los pezones cuartos y quintos de cada lado en una hembra control (D) y en una hembra transgénica (E). En la hembra transgénica se señalan mediante círculos rojos los pezones supernumerarios a cada lado. El pezón extra del lado derecho presenta un crecimiento tumoral (flecha). Los ratones fueron parcialmente afeitados para visualizar los pezones.

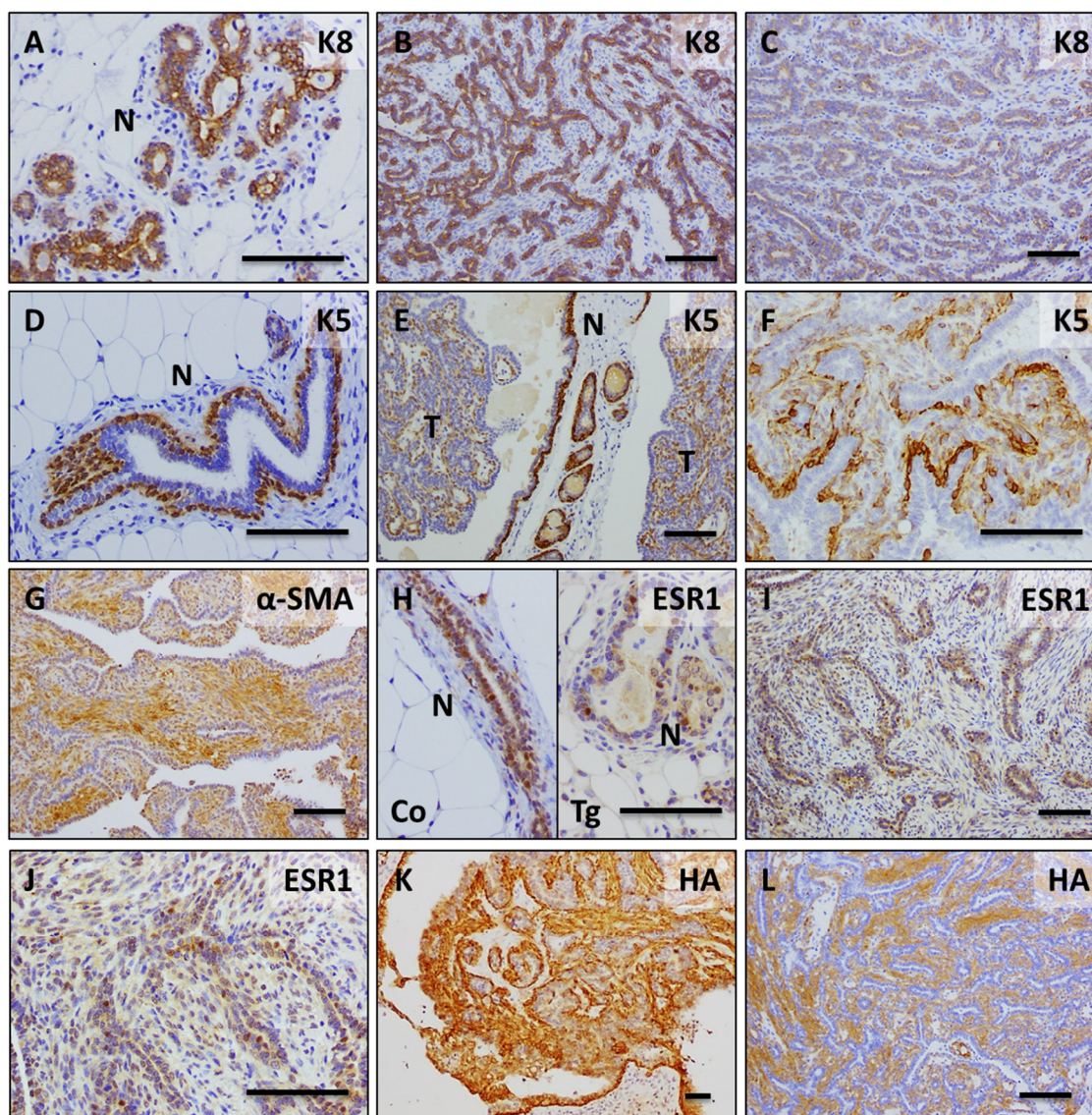
Por otro lado, histológicamente también hallamos en ocasiones alteraciones en el epitelio de los pezones, pudiendo observarse hiperplasias e hiperqueratosis, así como adenomas sebáceos o carcinomas originados en las células epiteliales del canal del pezón (obstruyendo completamente dicho canal en la mayoría de los casos) (**Figura 76A-76C**). De forma adicional, algunas hembras K5-ERAS presentaban pezones supernumerarios, localizados craneolateralmente al pezón de la cuarta glándula mamaria en ambos lados, pudiendo dar

lugar a la formación de tumores, de forma independiente a la gestación o lactación (**Figura 76D y 76E**).

Para caracterizar estos tumores mamarios en mayor profundidad, llevamos a cabo análisis inmunohistoquímicos de la queratina K8 (marcador de células epiteliales lumbinales), la queratina K5, la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (ambos marcadores de células mioepiteliales) y el receptor de estrógenos alfa, así como del epítipo HA (que nos permite visualizar la expresión del transgén). Por lo general, la expresión de estos marcadores fue bastante homogénea en todos los tumores mamarios analizados. Como ya hemos mencionado, estos tumores están formados principalmente por dos tipos celulares: un componente mioepitelial, formado por células de morfología fusiforme y tinción eosinófila, y un componente epitelial de morfología cuboidal y tinción basófila que rodea al anterior. Solo las células epiteliales cuboidales fueron positivas para la queratina K8. Sin embargo, el nivel de tinción de la queratina K8 en estas células fue variable inter- e intratumoralmente, pudiendo indicar un menor grado de diferenciación en aquellas regiones con bajos niveles de tinción (**Figura 77A-77C**). Por otro lado, confirmamos la naturaleza mioepitelial de las células fusiformes y eosinófilas mediante la tinción de la queratina K5 y la  $\alpha$ -SMA (**Figura 77D-77G**). Al igual que para la queratina K8, los niveles de tinción de la queratina K5 fueron variables. Observamos que en muchos casos, las células mioepiteliales tumorales presentaban una menor tinción de queratina K5 que las células mioepiteliales de conductos no transformados (**Figura 77D-77F**).

Además, observamos que algunas células epiteliales cuboidales de estos tumores mamarios fueron positivas para el receptor de estrógenos, mientras que las células mioepiteliales fueron negativas. No obstante, en ningún caso encontramos una tinción generalizada del tumor para este marcador, sino que el patrón de expresión de ESR1 fue semejante al de una glándula normal, tanto de animales transgénicos como de animales control, sugiriendo que el desarrollo de estos tumores ocurre de forma independiente a la expresión de este receptor hormonal (**Figura 77H-75J**). Finalmente, todos los tumores expresaban el transgén, estando asociada su expresión a las células positivas para la queratina K5 y observándose una pérdida de su expresión en las células epiteliales cuboidales (**Figura 77K y 77L**).





**Figura 77. Caracterización inmunohistoquímica de los tumores de mama generados en los ratones K5-ERAS.** A-C. Tinción para la queratina K8. A es una glándula normal de un animal transgénico. B y C son tumores donde observamos una tinción marcada y una tinción leve, respectivamente. D-F. Tinción de la queratina K5. D es una glándula normal de un animal transgénico. En las imágenes E y F observamos la variabilidad en la tinción de K5 en los tumores y la menor expresión en el tejido tumoral (T) respecto al tejido normal (N) en algunos tumores. G. Tinción de la  $\alpha$ -actina del músculo liso en las células mioepiteliales de los tumores. H-J. Tinción del receptor de estrógenos alfa. En H se muestra la tinción de las glándulas normales, tanto en un ratón control (Co) como en un ratón transgénico (Tg). Las imágenes I y J muestran la tinción de este receptor en las células epiteliales de los tumores mamarios. K-L. Tinción del epítipo HA en los tumores de mama. Las barras representan 100  $\mu$ m.

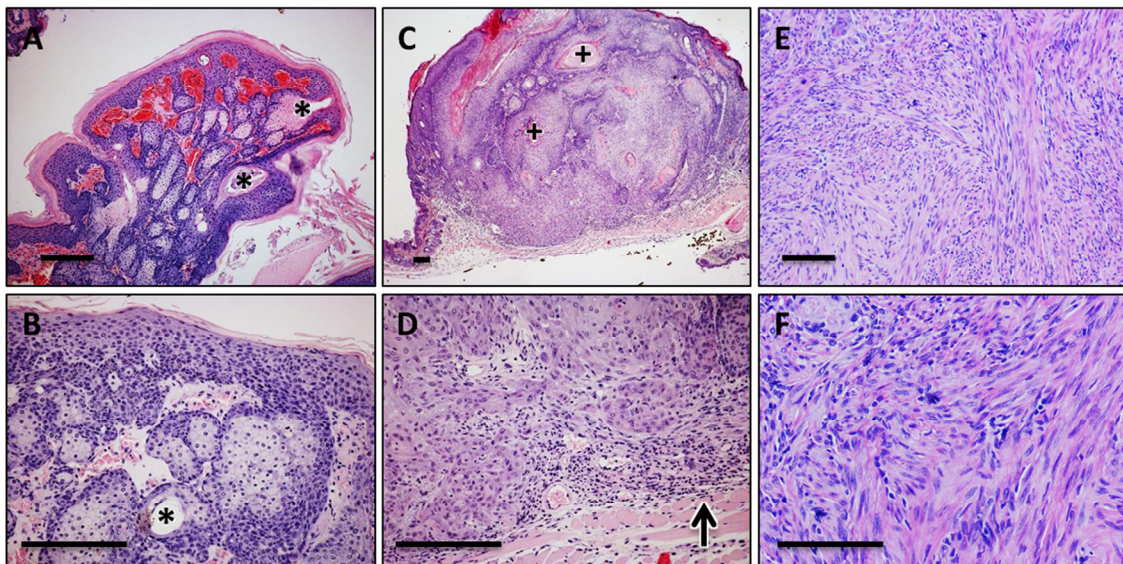
En conclusión, los ratones K5-ERAS desarrollan con una elevada frecuencia y número tumores mamarios de crecimiento rápido, los cuales recuerdan a los adenomioepiteliomas malignos humanos. Estos tumores presentan un componente epitelial que expresa la queratina K8 en cantidades variables, y un componente mioepitelial positivo para la queratina K5 y la  $\alpha$ -SMA con diferentes grados de diferenciación. Además, los tumores mamarios de los ratones K5-ERAS fueron negativos para el receptor de estrógenos. En general, la tinción de estos marcadores apoya el diagnóstico de adenomioepitelioma mamario, aunque sería



interesante evaluar la expresión de otros marcadores como la proteína p63, el marcador de superficie CD10, la calponina o la proteína S100<sup>150,151</sup>. Por tanto, los ratones K5-ERAS podrían constituir un nuevo modelo animal para el estudio de esta patología humana.

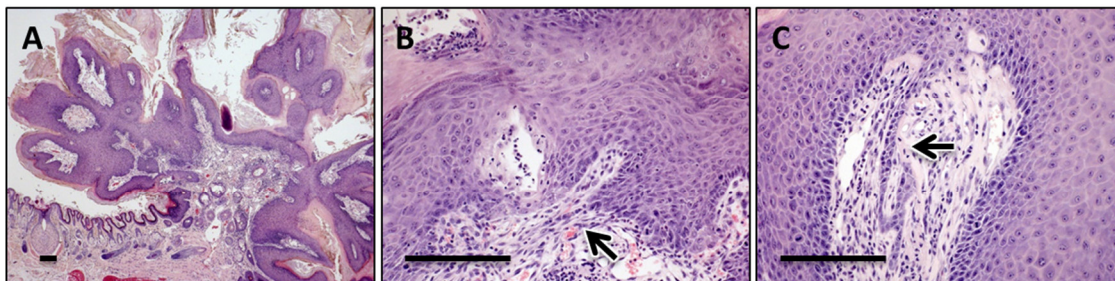
#### 4.3.3 Clasificación histopatológica de otros tumores epiteliales.

El análisis histopatológico de los tumores cutáneos generados en los ratones K5-ERAS mostró diferentes tipos tumorales, siendo los más habituales los adenomas y adenocarcinomas sebáceos (52%) y los carcinomas de células escamosas (38%). En general, estos animales desarrollan adenomas y adenocarcinomas sebáceos exofíticos y pedunculados, formados por lóbulos de células sebáceas maduras bien delimitados, con citoplasma vacuolizado y rodeados de células germinales indiferenciadas. En estos tumores también se observan conductos sebáceos con queratinización del epitelio escamoso y un gran desarrollo de vasos sanguíneos que suelen estar congestivos, proporcionando un color rojizo a los tumores (**Figura 78A y 78B**). Los ratones K5-ERAS también desarrollan carcinomas de células escamosas bien diferenciados con distintos grados de atipia, presentando perlas córneas y, en ocasiones, células gigantes multinucleadas. Estos carcinomas suelen ser invasivos, rompiendo la membrana basal y penetrando en la dermis (**Figura 78C y 78D**). En menor medida, encontramos carcinomas anaplásicos, formados por células fusiformes, con mucha atipia y pleomorfismo. Estos carcinomas presentaron un crecimiento muy rápido y un mayor carácter invasivo (**Figura 78E y 78F**).



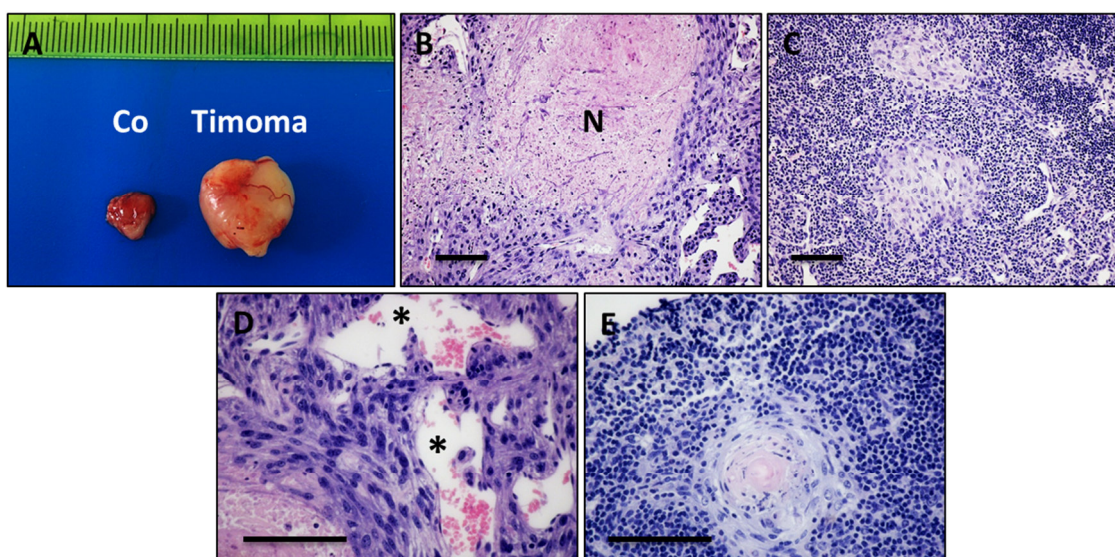
**Figura 78. Histopatología de los principales tumores cutáneos desarrollados en los ratones K5-ERAS.** A y B son adenocarcinomas sebáceos. Se observan conductos sebáceos con queratinización (asteriscos) y angiogénesis con congestión. C y D son carcinomas de células escamosas. Las cruces señalan perlas de queratina. La flecha indica una zona de invasión de la capa muscular. E y F son carcinomas indiferenciados de células fusiformes. Las barras representan 100  $\mu$ m.

En el epitelio oral, los ratones K5-ERAS desarrollaron tumores que se originaron principalmente en el epitelio labial, dando lugar a papilomas escamosos exofíticos (**Figura 79A**). Además, algunos de estos tumores presentan microcarcinomas escamosos que infiltran la dermis o el estroma tumoral, adquiriendo una morfología fusiforme (**Figura 79B y 79C**).



**Figura 79. Histopatología de los tumores orales desarrollados en los ratones K5-ERAS.** A. Papiloma escamoso exofítico. B y C. Invasión de la dermis por células fusiformes (flechas). Las barras representan 100 µm.

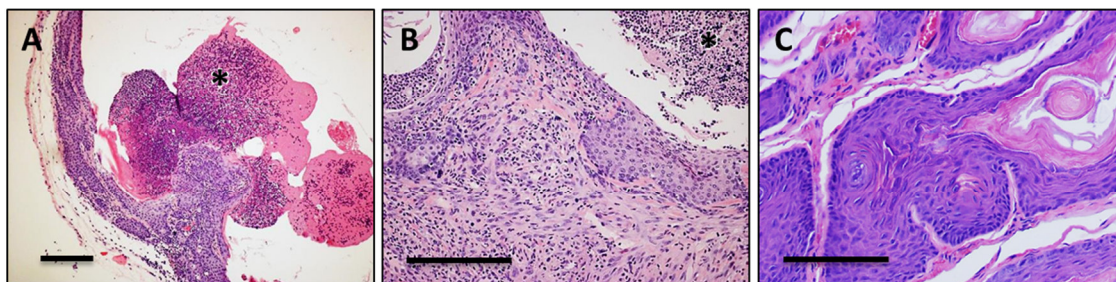
A pesar de que todos los ratones transgénicos K5-ERAS presentan alteraciones en la arquitectura y morfología del timo, solo 3 ratones de 97 desarrollaron tumores de origen epitelial tímico. En todos los casos, los timomas fueron hallazgos en el momento de la necropsia, ocupando casi por completo la cavidad torácica de los ratones (**Figura 80A**). Histológicamente, estos timomas estaban formados por una masa sólida de células epiteliales pleomórficas y atípicas, con núcleos picnóticos grandes y con nucléolos evidentes. En algunos se pueden observar hiperplasias de las células linfopiteliales, dando lugar a corpúsculos de Hassall de gran tamaño. Además, aunque todos ellos presentaban neoformación de vasos sanguíneos, dos mostraron necrosis isquémica en las regiones centrales (**Figura 80B-80E**).



**Figura 80. Histopatología de los tumores de origen tímico desarrollados en los ratones K5-ERAS.** A. Imagen macroscópica de un timoma comparado con el timo de un ratón control. B y C. Imágenes histológicas de un timoma, observándose necrosis por coagulación en las zonas centrales (N) y un crecimiento aberrante de las células linfopiteliales. D. Neoformación de vasos sanguíneos (asteriscos) con células tumorales en su interior. E. Corpúsculo de Hassall aberrante. Las barras representan 50 µm.



Por último, tres machos desarrollaron carcinomas escamosos moderadamente diferenciados originados a partir del epitelio de los conductos de la glándula prepucial. Estos tumores dieron lugar a la obstrucción de los conductos, produciendo un aumento de tamaño de la glándula prepucial por retención de su contenido glandular, encontrándose acompañado de un infiltrado de neutrófilos degenerados en algunos casos (**Figura 81A y 81B**). Otro de los machos desarrolló un carcinoma escamoso originado en el epitelio del pene, impidiéndole la retracción del mismo dentro del prepucio (**Figura 81C**).



**Figura 81. Histopatología de otros tumores desarrollados en los ratones K5-ERAS.** A y B. Carcinoma de glándula prepucial con contenido glandular y neutrófilos degenerados (asteriscos). C. Carcinoma escamoso del epitelio del pene. Las barras representan 100  $\mu\text{m}$ .

En resumen, aparte de tumores mamarios, los ratones K5-ERAS desarrollan tumores cutáneos y orales, principalmente, con diferentes grados de malignización. Serán necesarios estudios posteriores para caracterizar en profundidad la naturaleza de estos tumores y las vías moleculares implicadas en su desarrollo.

#### 4.4 Influencia de la gestación y lactación en el desarrollo de tumores mamarios en las hembras K5-ERAS.

A pesar de que los tumores mamarios de los ratones K5-ERAS no presentaron una sobreexpresión del receptor de estrógenos, decidimos evaluar la influencia de los estímulos hormonales que acontecen durante las fases de gestación y lactación en el desarrollo de estos tumores mamarios. Para ello, comparamos la aparición de dichos tumores en hembras vírgenes con respecto a hembras que han experimentado varios ciclos de gestación (no asociados siempre a lactación, como se mencionó previamente, por los problemas de estasis láctea y consiguiente involución mamaria observados en estas hembras). Cuando comparamos ambos grupos, no observamos diferencias en la edad media de aparición de los tumores mamarios entre las hembras vírgenes y las hembras sometidas a repetidos ciclos de gestación (7,1 meses frente a 7,2 meses, respectivamente). De igual forma, tampoco se observaron diferencias en el número promedio de tumores mamarios por animal entre ambos grupos, siendo superior a 10 en ambos casos (**Tabla 13**). Por lo cual, podemos concluir que el

desarrollo y progresión de los tumores mamarios originados por la expresión aberrante del transgén ERAS es independiente de estímulos hormonales.

Genotipo	Estado reproductivo	Nº animales	Edad de aparición de tumores	Edad de sacrificio	Nº partos	Nº tumores
Transgénico	Cría	13	7,1	8,5	3	>10
	Virgen	9	7,2	9	0	>10
Control	Cría	7	-	10,7	5	0
	Virgen	7	-	10,4	0	0

**Tabla 13. Relación entre el estado reproductivo de las hembras K5-ERAS y la aparición de tumores mamarios.** Las edades de aparición y sacrificio corresponden al promedio de los meses de cada grupo. El número de partos y de tumores representan el promedio de cada grupo.

En resumen, las tres líneas de ratones transgénicos K5-ERAS desarrollan diferentes tipos de tumores de origen epitelial, entre los que destacan por frecuencia y número los tumores de glándula mamaria. Los tumores mamarios de los ratones K5-ERAS son negativos para el receptor de estrógenos alfa y su crecimiento es independiente de estímulos hormonales. Estos tumores comparten similitudes morfológicas y moleculares con los adenomioepiteliomas mamarios humanos y tienen un comportamiento maligno, caracterizado por un crecimiento rápido y la invasión del tejido. En definitiva, los ratones K5-ERAS son buenos candidatos para su empleo como un nuevo modelo animal para estudiar en mayor profundidad el comportamiento biológico de los adenomioepiteliomas malignos humanos, un tumor poco frecuente y poco estudiado hasta el momento.





## ***Discusión -***

---



## Discusión -

### 1. -Identificación de nuevos genes implicados en cáncer de mama mediante el sistema de transposición “*sleeping beauty*”.

La generación de tumores mediante el sistema de transposición “*sleeping beauty*” en ratones heterocigotos para el gen *Trp53* nos han permitido identificar genes cuyas alteraciones suponen eventos importantes en el desarrollo de tumores mamarios. Varios autores han demostrado que, al contrario que los retrovirus, los transposones “*sleeping beauty*” no presentan una preferencia significativa por integrarse cerca de genes transcripcionalmente activos, sino que sus sitios de integración se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma<sup>152,153</sup>. Basándonos en estas observaciones, podemos concluir que la generación de un tumor tendría lugar cuando la combinación adecuada de integraciones de los transposones en un conjunto de genes confiera una ventaja selectiva a las células. Por lo tanto, al menos algunos de los sitios de integración seleccionados en nuestro modelo animal corresponderán a genes cuya alteración sea un evento importante en el desarrollo del cáncer.

Este sistema de transposición se desarrolló específicamente como una herramienta para identificar genes implicados en el desarrollo tumoral en ratones transgénicos. En los últimos años se ha usado con éxito en varios laboratorios para identificar genes causantes de cáncer en múltiples tejidos y, además, se ha demostrado que muchos de estos genes son relevantes desde el punto de vista clínico<sup>77,154,155</sup>. El 33% de los genes identificados en nuestro estudio han sido causalmente implicados en cáncer y están incluidos en el *Cancer Gene Census* (v78; 05/09/2016). Entre ellos, destacan los genes *PTEN* y *GATA3*, cuyas mutaciones son muy frecuentes en cáncer de mama<sup>42,45,81</sup>. Las mutaciones en el gen *PTEN* se han asociado con el desarrollo de cáncer de mama triple negativo, favoreciendo la activación del mecanismo de EMT y promoviendo así la metástasis<sup>84,156</sup>. Además, se sabe que la delección combinada de *Pten* y *Trp53* en el epitelio mamario de ratones transgénicos da lugar al desarrollo de tumores de mama de tipo “*claudin-low*”<sup>157</sup>. Por su parte, *GATA3* es importante para la diferenciación de las células luminales de mama y está asociado a los tumores de subtipo luminal A<sup>45,81</sup>.

Muy recientemente se ha publicado un estudio en el cual también se generaron ratones con mutación por “*sleeping beauty*” en células que expresan la queratina K5 en la glándula mamaria en fondo *Pten*+/-; estos ratones también desarrollaron tumores mamarios. La identificación de los sitios de integración del transposón en estos tumores reveló una lista de 24 CIS, 6 de los cuales (*Pten*, *Rasa1*, *Nf1*, *Trps1*, *Fbxw7* y *Nfib*) fueron coincidentes con los CIS

de nuestros ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/-, reforzando así nuestros hallazgos. Además, en ambos estudios y en todos los casos comprobables, la orientación de los transposones sugiere la pérdida de función de estos genes, indicando su posible papel como supresores tumorales y reafirmando su importancia en el desarrollo de los tumores mamarios, especialmente en un contexto *Trp53*+/- o *Pten*+/-<sup>158</sup>.

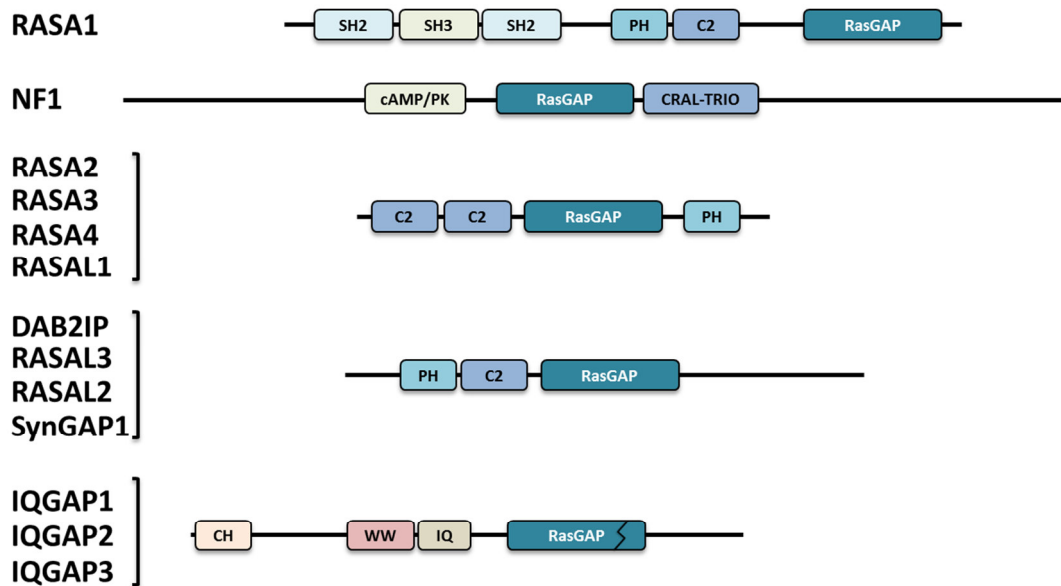
Nosotros hemos demostrado que la inserción del transposón T2/Onc2 en la región 5' del gen *Eras* induce su expresión en los tumores mamarios de los ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/- . Por otro lado, también se han encontrado inserciones en el gen *Eras* en otros tipos de tumores generados mediante el sistema de transposición “*sleeping beauty*”, incluyendo el cáncer de piel no melanoma<sup>80</sup>, el melanoma<sup>137</sup>, leucemias y linfomas<sup>159</sup>, osteosarcomas<sup>160</sup>, neuroblastomas<sup>161</sup> y tumores malignos de la vaina de nervios periféricos<sup>146</sup>. En todos los casos, las inserciones se localizaron en la región 5' del gen y en su misma dirección transcripcional, sugiriendo la activación de *Eras* en estos tumores. Además, *Eras* también ha sido identificado como un posible oncogén mediante mutagénesis insercional por retrovirus en linfomas<sup>162</sup> y tumores de glándula mamaria<sup>163</sup> generados en ratones. En su conjunto, estos datos apuntan hacia la capacidad de *Eras* para actuar como un oncogén en múltiples tejidos.

## 2. Importancia de los genes Ras-GAP en el cáncer de mama.

Como ya hemos destacado, las mutaciones activadoras de los 3 miembros principales de la familia Ras (*H-*, *K-* y *N-RAS*) son algunas de las más frecuentes en los tumores humanos; sin embargo, estas mutaciones son raras en el cáncer de mama, encontrándose en menos del 1% de los tumores. A pesar de esta ausencia de mutaciones en los principales miembros de la familia Ras, existen evidencias que sugieren la activación de la vía de señalización de Ras en un subconjunto de tumores mamarios y su importancia en la progresión del cáncer. En primer lugar, la firma génica transcripcional de Ras es muy frecuente en los tumores de mama triple negativos o de tipo basal, confirmándose una activación generalizada de la vía Ras en estos tumores mediante análisis integrativos<sup>84,164</sup>. Asimismo, algunas líneas celulares de cáncer de mama de tipo basal presentan un patrón de expresión génica similar al mostrado por la activación de la vía de Ras y son particularmente sensibles a inhibidores de MAP quinasas<sup>165,166</sup>. Por otro lado, las células mamarias humanas transducidas con un gen *K-RAS* mutante dan lugar a la formación de carcinomas ductales invasivos<sup>167</sup> y los ratones transgénicos MMTV-RAS y WAP-RAS desarrollan tumores mamarios, los cuales presentan una aparición más temprana y un comportamiento más agresivo en un fondo genético p53+/-<sup>168</sup>.

La vía de señalización de Ras puede activarse mediante diferentes mecanismos independientes de las mutaciones activantes en los genes miembros de esta familia, como por ejemplo la pérdida de función de genes Ras-GAP. Existen 14 genes en el genoma humano que contienen un dominio Ras-GAP; sin embargo, estos genes comparten pocas similitudes fuera de esta región, sugiriendo que presentan funciones diferentes (**Figura 82**). Por lo general, las regiones que flanquean los dominios Ras-GAP promueven las interacciones con lípidos y proteínas, así como la unión a segundos mensajeros y la fosforilación mediada por proteína-quinasa. Por ello, cada proteína con función Ras-GAP puede tener GTPasas dianas específicas. Además, parece que la actividad Ras-GAP y sus efectos en la señalización están regulados por factores de crecimiento específicos, actuando de una manera dependiente de tejido y en un contexto específico<sup>169–171</sup>. En su conjunto, estos datos indican que la regulación de estas proteínas Ras-GAP es muy compleja, por lo que aún se conoce relativamente poco sobre su función precisa y su regulación en procesos normales o en el cáncer. Recientemente se han publicado diversos artículos que relacionan las alteraciones de varios genes Ras-GAP con el desarrollo y la progresión tumoral, como por ejemplo las mutaciones inactivantes del gen *RASA2* en el melanoma<sup>172</sup>, el papel dual de *RASAL2* como supresor tumoral u oncogén en distintos subtipos de cáncer de mama<sup>173,174</sup> y el silenciamiento transcripcional mediado por mecanismos epigenéticos de *RASAL1* en el cáncer colorrectal<sup>175</sup> y de *DAB2IP* en cáncer de mama y de próstata<sup>110,176</sup>.

Más del 50% de los tumores de mama generados en nuestros ratones SB/T2 y SB/T2/p53+/- presentaron integración del transposón en los genes Ras-GAP *Nf1* y/o *Rasa1*, sugiriendo que su inactivación es un evento importante en la tumorigénesis mamaria de estos ratones (**Figura 11**). Se sabe que las mutaciones o deleciones del gen *NF1* predisponen al desarrollo de diversos tipos tumorales, entre los que se incluyen los tumores mamarios<sup>47,90–94</sup>. Por otro lado, la represión de *RASA1* mediada por la acción de miR-31 ha sido asociada con una mayor proliferación y tumorigénesis en el cáncer colorrectal<sup>102</sup>. Asimismo, las alteraciones en el locus de *RASA1* han sido asociadas con los tumores prostáticos más agresivos<sup>103</sup>. Sin embargo, el papel de las mutaciones o alteraciones en el gen *RASA1* en el cáncer de mama no ha sido descrito hasta el momento.



**Figura 82. La familia Ras-GAP.** Esquema de las proteínas y los dominios proteicos de los genes con función Ras-GAP predicha en el genoma humano. Todos contienen el dominio Ras-GAP pero comparten pocas similitudes aparte de esta región. Los miembros de la subfamilia IQGAP contienen un aminoácido alternativo dentro del dominio catalítico, y por lo tanto no exhiben actividad Ras-GAP, pero aun así modelan la vía de señalización de Ras. La estructura de la proteína Ras-GAP PLXNB2 es diferente y no se muestra. (Basado en Ophélie Maertens & Karen Cichowski; *Advances in Biological Regulation*, 2014<sup>177</sup>).

Existen diversos indicios que sugieren que el gen *RASA1* puede jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama. Por ejemplo, niveles reducidos de expresión de *RASA1* han sido asociados con peor supervivencia en pacientes con carcinomas ductales invasivos<sup>178</sup>. Además, la pérdida de la región cromosómica 5q14, donde se localiza el gen *RASA1*, es un evento frecuente en el cáncer de mama, estando asociado a los tumores de tipo basal y a aquellos con mutaciones en el gen *BRCA1*<sup>179–181</sup>. La pérdida parcial del cromosoma 5 es una marca característica de uno de los 10 grupos establecidos por el consorcio METABRIC (este consorcio clasifica los tumores de mama humanos de acuerdo con sus perfiles de expresión génica y las alteraciones en el número de copias)<sup>43,44</sup>. Este grupo incluye principalmente tumores triple negativos con perfiles de expresión génica correspondientes a tumores de tipo basal y presenta la tasa más elevada de mutaciones en el gen *TP53*<sup>44</sup>.

En este trabajo, hemos observado que existe una fuerte correlación entre la reducción de los niveles de expresión de *RASA1* y la presencia de mutaciones en el gen *TP53*, siendo un evento frecuente en los tumores de mama humanos de tipo basal o triple negativos. Asimismo, la disminución parcial de los niveles de expresión de *RASA1* en las células MCF10A en un contexto p53 mutante, fue suficiente para promover una fuerte activación de la vía de señalización de Ras, junto con la inducción del proceso de EMT y la adquisición de un fenotipo más invasivo, sugiriendo que la haploinsuficiencia de *RASA1* es suficiente para malignizar las



células epiteliales mamarias en un contexto p53 mutante. De forma adicional, evaluamos la activación de la vía de Ras en diferentes líneas de cáncer de mama tras disminuir la expresión de RASA1 mediante el empleo de shARNs. Pudimos observar que aquellas líneas que presentaban mutaciones en el gen *TP53* mostraron un aumento en los niveles de fosforilación de ERK y/o AKT cuando se redujeron los niveles de expresión de RASA1, mientras que las líneas carentes de estas mutaciones o con mutaciones en algún gen de la familia Ras, no presentaban esta inducción (datos no mostrados). Estos resultados confirman, una vez más, la colaboración existente entre la alteración de ambos genes para inducir la activación de la vía de Ras.

En concordancia con estos resultados, existen diversos estudios que correlacionan las alteraciones de algunos genes supresores tumorales, como *TP53* y *PTEN*, con la pérdida de función de genes Ras-GAP. Por ejemplo, la pérdida del gen *NF1* requiere de la presencia de mutaciones en *TP53* para evadir la senescencia y conducir a la malignización en gliomas y tumores malignos de la vaina de los nervios periféricos<sup>182–185</sup>. También se ha observado una asociación entre la expresión aberrante de p53 y la disminución en los niveles de expresión de RASAL1 en el cáncer colorrectal<sup>175</sup>. En ratones, la inactivación conjunta de *Nf1* y *Pten* da lugar al desarrollo de tumores de la vaina de nervios periféricos de alto grado de malignidad<sup>186</sup> y los transgénicos nulos para *Rasa2* desarrollan un mayor porcentaje de tumores sólidos con capacidad metastásica cuando se cruzan con ratones mutantes para *Trp53*<sup>173</sup>. Por otro lado, también se ha visto la pérdida simultánea de más de un gen de la familia Ras-GAP en algunos tipos tumorales. Por ejemplo, las mutaciones concomitantes de *RASA2* y *NF1* ocurren con una elevada frecuencia en el melanoma, sugiriendo la colaboración de ambos Ras-GAP en este tipo tumoral<sup>172</sup>. En el cáncer de mama, la reducción conjunta de los niveles de expresión de *RASAL2* y *DAB2IP* es un evento frecuente en los tumores de tipo luminal B más agresivos, promoviendo la invasión, el proceso de EMT y la metástasis<sup>176</sup>. De forma adicional, el 14% de los tumores generadores en los ratones con transposición de nuestro estudio mostraron inserción del transposón en *Rasa1* y *Nf1* de forma conjunta. Por lo tanto, parece que la colaboración entre las alteraciones de los distintos genes Ras-GAP y otros genes importantes para el desarrollo tumoral es un evento frecuente y necesario en diversos tipos de cáncer, dando lugar a tumores más agresivos y de peor pronóstico.

El cáncer de mama triple negativo representa el 15-20% de todos los tumores mamarios, siendo tumores más agresivos y con peor pronóstico. Además, presentan una mayor tasa de mortalidad y una mayor recurrencia junto con el desarrollo temprano de metástasis. Esto se debe en parte a la elevada proporción de alteraciones genómicas de estos tumores junto con

la falta de dianas terapéuticas específicas<sup>42,45,47</sup>. La elevada heterogeneidad de los tumores triple negativos dificulta establecer un pronóstico certero y ajustado al paciente y, además, las opciones de tratamiento de estos tumores son limitadas, estando restringidas a la quimioterapia convencional combinada con la cirugía y la radioterapia. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos marcadores que ofrezcan un valor pronóstico predictivo y/o que permitan establecer terapias dirigidas (o predecir la resistencia a estas), es de vital importancia en este subtipo tumoral. Nuestros resultados abren una posible vía de terapia específica en estos tumores; dado que la pérdida alélica de *RASA1* da lugar a la activación de la vía de Ras, los tumores que presentan esta alteración podrían ser tratados con inhibidores de moléculas efectoras de Ras como, por ejemplo, MEK o ERK. Por otro lado, se ha demostrado que la elevada activación de la vía de Ras puede conferir resistencia a ciertas terapias. Por ejemplo, la pérdida de *NF1* ha sido identificada como un mediador de la resistencia al tamoxifeno en líneas celulares de cáncer de mama<sup>187</sup>. Por lo cual, resultaría interesante evaluar si la reducción de los niveles de expresión de otros genes Ras-GAP, como *RASA1*, juega un papel en la resistencia al tratamiento del cáncer de mama y de otros tipos de cáncer.

En su conjunto, todos estos datos indican que *RASA1* actúa como un gen supresor tumoral en los tumores mamarios humanos, en especial, en el cáncer triple negativo. Sin embargo, cuando redujimos la expresión de *RASA1* casi completamente en las células MCF10A (sin mutación en *TP53*) no observamos la adquisición de características de malignidad ni la activación de la vía de señalización de Ras, sino que adquirieron un fenotipo más epitelial y una menor capacidad de proliferación y migración (**Figuras 20-23**). Hay que subrayar que, al igual que otras proteínas de esta familia, *RASA1* también desempeña otras funciones independientes de su actividad Ras-GAP. Existen múltiples evidencias de que *RASA1* juega un papel importante en la regulación de la polaridad y la migración celular a través de su interacción con proteínas que presentan un dominio Rho-GAP, actuando así como un mecanismo de comunicación cruzada entre las vías de señalización de las GTPasas Ras y Rho. Una de las interacciones más estudiadas hasta el momento es la de *RASA1* con la proteína p190-RhoGAP. Cuando la proteína p190-RhoGAP es fosforilada por Src (principalmente en el residuo Tyr1105), los dominios SH2 de la región N-terminal de *RASA1* se pueden unir a este residuo fosforilado. Esta unión activa la función Rho-GAP de p190-RhoGAP, inhibiendo así a la GTPasa RhoA y causando la disrupción de las fibras de estrés de actina y la reducción de los focos de adhesión celular<sup>188,189</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la interrupción de este complejo con péptidos inhibidores impide la migración y la polarización<sup>190</sup>. Además, se sabe que los fibroblastos de ratón nulos para *Rasa1* tienen defectos en la elongación celular y la

polaridad, resultando en una migración alterada<sup>190</sup>, y que los fibroblastos de rata que sobreexpresan un dominante negativo de la proteína p190-RhoGAP muestran un fenotipo muy similar<sup>191</sup>, apoyando su papel conjunto en la polaridad y la migración celular. Sin embargo, también ha sido reportado que el dominio SH3 de RASA1 es capaz de unirse al dominio Rho-GAP de la proteína DLC1 (un potente supresor tumoral que está frecuentemente inactivado en varios tipos de cáncer humano), inhibiendo su actividad Rho-GAP y activando la vía de señalización de Rho<sup>97</sup>. Estos datos ponen de manifiesto la complejidad de los mecanismos de señalización y regulación de RASA1, pudiendo interactuar con diversas proteínas y desempeñar distintas funciones dependiendo del contexto celular.

La inhibición de la formación de los complejos entre RASA1 y p190-RhoGAP podría explicar por qué la pérdida casi total de RASA1 en las células MCF10A-sh1 dio lugar a un fenotipo más epitelial y menos migratorio, dado que la elevada activación de RhoA da lugar a una inhibición de la motilidad<sup>192,193</sup>. Recíprocamente, células MCF10A sobreexpresando RASA1 (no mostrado) presentan un fenotipo opuesto al observado tras la pérdida de esta proteína, es decir, una morfología mesenquimal acompañada de una mayor capacidad de migración y proliferación, sugiriendo que RASA1 está llevando a cabo funciones independientes a su actividad Ras-GAP en las células MCF10A. A la luz de estos resultados, sería necesario llevar a cabo un estudio más exhaustivo para determinar las vías moleculares a través de las cuales RASA1 ejerce sus diversas funciones en las células epiteliales mamarias.

Curiosamente, cuando analizamos la variación del número de copias del gen *RASA1* en los tumores de mama humanos usando la base de datos TCGA, no solo observamos que los tumores de tipo basal o triple negativo presentaban un mayor porcentaje de pérdidas alélicas de *RASA1*, sino que también se observó un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de ganancias alélicas de este gen en los tumores de tipo luminal (23,5%; 76 de 323) y en los tumores positivos para el receptor de estrógenos (21,2%; 126 de 594) cuando se compararon con los tumores no luminales (3,2%; 5 de 158) o negativos para el receptor de estrógenos (5,7%; 10 de 174), respectivamente ( $p < 0,0001$  en ambos casos; test exacto de Fisher; **Figura 17**), sugiriendo que la amplificación del gen *RASA1* (y el consiguiente aumento en sus niveles de expresión; **Figura 18A**) podría jugar algún papel en estos subgrupos tumorales. Se ha observado que otros genes Ras-GAP pueden desempeñar el papel de oncogenes o, incluso, actuar como supresores tumorales u oncogenes dependiendo del contexto tumoral. Por ejemplo, el gen *RASAL2* juega un papel dual en el cáncer de mama, dependiendo su función del estatus de EMT del tumor. En los tumores de tipo luminal

(preferentemente luminal B), *RASAL2* actúa como un gen supresor tumoral, siendo frecuente la disminución de sus niveles de expresión debido a una alta metilación de su promotor, favoreciendo así el crecimiento tumoral y la metástasis mediante la activación de la vía de señalización de Ras<sup>173</sup>. Sin embargo, en los tumores triple negativos, *RASAL2* actúa como un oncogén, ejerciendo su función de forma independiente a su dominio catalítico y promoviendo la invasión y la metástasis mediante la activación de Rac1 y la consecuente inhibición de RhoA<sup>174</sup>. Por otro lado, los Ras-GAP *IQGAP1* e *IQGAP2* presentan papeles opuestos, comportándose como un oncogén y un supresor tumoral, respectivamente, en diversos tipos tumorales<sup>177</sup>. Nuevamente se pone de manifiesto la complejidad de las funciones y los mecanismos de señalización de los genes Ras-GAP, pudiendo desempeñar diversos papeles dependiendo del contexto, tanto en tejido normal como tumoral. Sería interesante llevar a cabo nuevos estudios para elucidar el papel del gen *RASA1* en los tumores de mama de tipo luminal o en aquellos positivos para el receptor de estrógenos y su posible contribución al desarrollo tumoral, así como las asociaciones específicas que le permiten llevar a cabo sus múltiples funciones en diferentes contextos.

En conclusión, en este trabajo se ha demostrado que la delección del gen *RASA1* (probablemente asociada con mutaciones en el gen *TP53*) promueve el desarrollo y/o progresión del cáncer de mama, concretamente en los tumores de tipo basal o en aquellos negativos para el receptor de estrógenos (es decir, los tumores de mama con peor pronóstico). Así, nuestros resultados apoyan que la activación de la vía de señalización de Ras, de forma independiente a las mutaciones en los genes Ras, sea un mecanismo de tumorigénesis en los tumores de mama humanos. En definitiva, existe un gran número de evidencias que indican la creciente importancia de los genes Ras-GAP en el desarrollo del cáncer. Como ya se ha destacado, la reducción de los niveles de expresión de proteínas con función Ras-GAP es un mecanismo alternativo para la activación de la vía de señalización de Ras; sin embargo, las implicaciones de las diferentes alteraciones en estos genes suponen un enigma en gran parte a día de hoy, promoviendo en algunos casos la activación de vías oncogénicas adicionales. Por ello, es de vital importancia una mayor comprensión de los mecanismos que regulan los niveles de expresión y la actividad Ras-GAP de estos genes, así como las consecuencias biológicas de su desregulación. De este modo, estas proteínas podrían usarse como biomarcadores desde un punto de vista clínico, pudiendo ser utilizadas como factores predictivos del pronóstico y/o la resistencia a terapias dirigidas.

### 3. ERAS: un nuevo oncogén en el cáncer de mama.

El gen *Eras* juega un papel importante durante el desarrollo embrionario temprano del ratón, expresándose en las células madre embrionarias indiferenciadas hasta el estadio de blastocisto, momento a partir del cual disminuye su expresión en el mesodermo, favoreciendo así su diferenciación<sup>104,194</sup>. Sin embargo, aunque existen algunos indicios que sugieren que *ERAS* no se expresa en las células embrionarias humanas<sup>195,196</sup>, su posible papel en el desarrollo embrionario humano temprano es desconocido e incierto hasta el momento. La delección de *Eras* en células madre embrionarias de ratón conduce a una clara disminución de la proliferación celular pero no afecta a su morfología y pluripotencia<sup>104</sup>. Aunque no se ha publicado ningún estudio exhaustivo sobre ratones “knockout” para *Eras*, es conocido que la inyección de las células madre embrionarias de ratón nulas para *Eras* en blastocistos resulta en la transmisión de la mutación sin afectar al crecimiento o la fertilidad de los ratones<sup>104</sup>. Por otro lado, la sobreexpresión o expresión permanente de *Eras* en las células madre embrionarias de ratón conduce a un aumento de la proliferación celular y al desarrollo de teratomas cuando son inyectadas en ratones inmunodeficientes; esta función es específica de *Eras*, y no causada por simple activación de la vía de Ras, ya que la sobreexpresión de una forma mutada del gen *H-RAS* (*H-RAS*<sup>G12V</sup>) da lugar a la diferenciación y a un retraso en el crecimiento celular<sup>104,197,198</sup>. Además, Nakhaei-Rad y colaboradores han demostrado que *Eras* se expresa en las células estrelladas del hígado de la rata, las cuales presentan características de células madre mesenquimales, siendo ésta la primera y única descripción de la expresión de *Eras* en tejidos adultos fuera de un contexto tumoral. En estas células, *Eras* juega un papel fundamental en el mantenimiento de la quiescencia, perdiéndose su expresión tras la activación del ciclo celular, probablemente debido a un incremento en la metilación de su promotor<sup>147</sup>. Por lo tanto, parece que *ERAS* puede desempeñar diversas funciones durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento del estatus de célula madre durante el desarrollo, o incluso, en tejidos adultos.

Como ya se ha comentado previamente, *ERAS* ha sido considerado un pseudogén durante mucho tiempo, por lo cual, no ha sido incluido en los análisis masivos de expresión génica hasta hace pocos años. Por ejemplo, uno de los sistemas de “microarrays” de ADN más ampliamente utilizados, el “Human Genome U133” de Affymetrix, no incluye sondas para *ERAS*. Por estas razones, la expresión de este gen ha sido estudiada escasamente, siendo aún desconocido en gran parte su papel en el desarrollo y la tumorigénesis. A pesar de ello, varios estudios han mostrado que *ERAS* se puede expresar en un contexto tumoral y se ha observado

su expresión en cierto porcentaje de tumores gástricos humanos<sup>107,108</sup>. Sin embargo, la implicación de *ERAS* en el desarrollo y/o progresión de cáncer de mama no ha sido descrita hasta ahora. Nosotros hemos demostrado que, aunque con baja frecuencia, *ERAS* se expresa de forma aberrante en algunos tumores mamarios humanos. En este estudio hemos identificado dos tumores mamarios que mostraron expresión de la proteína *ERAS* mediante técnicas inmunohistoquímicas. Uno de ellos es un tumor de subtipo luminal B-HER2, mientras que el otro no ha podido ser clasificado debido a la limitada información clínica disponible. Por lo tanto, se debe subrayar la necesidad de nuevos estudios para estimar qué frecuencia de tumores mamarios expresan *ERAS*, así como si se expresa de forma preferente en algún subtipo tumoral. Los análisis llevados a cabo a partir de la base de datos TCGA sugieren que los tumores de tipo basal o los tumores negativos para el receptor de estrógenos expresan *ERAS* con una mayor frecuencia y con niveles más elevados de expresión, indicando que *ERAS* podría jugar un papel en estos subtipos tumorales. No obstante, los estudios de expresión de *ERAS* presentan la dificultad de definir el umbral a partir del cual se considera expresión. A pesar de que en condiciones normales *ERAS* se encuentra silenciado, muchas de las muestras normales y tumorales de la base de datos TCGA muestran niveles de expresión muy bajos, por lo cual, discernir entre las señales de fondo y la expresión real de *ERAS* entraña ciertas dificultades. Considerando que las muestras de tejido normal no deben expresar este gen, establecimos un umbral de dos desviaciones estándar por encima del valor medio de expresión de las muestras control y consideramos positivos aquellos niveles de expresión superiores a este umbral. Con el fin de comprobar la consistencia de nuestros resultados, repetimos los análisis con diferentes umbrales de expresión y no observamos cambios significativos en las conclusiones.

Dado que *ERAS* es una Ras-GTPasa constitutivamente activa sin necesidad de mutaciones, su inactivación es primordial para restringir sus fuertes propiedades tumorigénicas. Aunque hay varias evidencias que indican que *ERAS* se expresa en diversas líneas celulares tumorales humanas y en algunos tipos de cáncer, el mecanismo por el cual el gen *ERAS* está silenciado en condiciones normales no está claro. Varios estudios sugieren que el silenciamiento de *ERAS* está asociado con una regulación transcripcional epigenética mediante mecanismos que incluyen la metilación de islas CpG y la deacetilación de histonas<sup>145–147,199</sup>. A través de análisis bioinformáticos, identificamos una región rica en islas CpG en el primer intrón de *ERAS*, la cual mostró una tendencia hacia la hipometilación en los tumores cuando fueron comparados con las muestras de tejido normal. Además, encontramos una correlación negativa entre los niveles de metilación de esta región y la expresión de *ERAS*, sugiriendo que la activación de *ERAS* en los tumores mamarios podría estar mediada por procesos epigenéticos. Sin embargo,



estas modificaciones epigenéticas no son del todo inesperadas, dado que *ERAS* se localiza en el cromosoma X y las alteraciones de este cromosoma son comunes en el cáncer de mama. En estos tumores, y en particular en los de tipo basal o triple negativos, el cromosoma X inactivo (Xi) es epigenéticamente inestable, dando lugar a alteraciones transcripcionales con elevada frecuencia. La inactivación del cromosoma Xi se revierte de forma frecuente en estos tumores, estando asociada con la sobreexpresión de genes ligados al cromosoma X<sup>200–202</sup>. Así, cuando analizamos la expresión de *ERAS* en la cohorte “Cell 2015” a través del “cBioPortal for Cancer Genomics”, observamos que existe una correlación positiva significativa con la expresión de varios genes localizados en la región cromosómica Xp11.23 (alrededor del locus *ERAS*), como *HDAC6*, *WDR13* y *PQBP1*, sugiriendo que la reactivación de esta región cromosómica es un evento de relativa frecuencia en estos tumores. Por lo tanto, la inestabilidad epigenética del cromosoma Xi podría dar lugar a la reactivación de *ERAS*, promoviendo la malignización y la metástasis en los tumores triple negativos. A pesar de estos indicios, sería necesario llevar a cabo estudios de metilación en tumores de mama humanos con el fin de verificar estos resultados.

Nuestros resultados indican que la expresión inapropiada de *ERAS* en las células MCF10A es suficiente para causar todos los procesos que definen la transición epitelio-mesénquima: incremento en motilidad, pérdida de adhesión, reorganización del citoesqueleto, alteración en el patrón de expresión de cadherinas, e inducción de genes y factores de transcripción involucrados en este mecanismo<sup>49</sup>. Además, *ERAS* induce en estas células la adquisición de características de células madre, generando una población mayoritariamente CD44<sup>hi</sup>/CD24<sup>-/low</sup> tras su expresión. Diversos estudios han establecido la relación entre el proceso de EMT y la adquisición de características de células madre en tumores de mama humanos<sup>129,203</sup>. De forma similar, se sabe que la expresión de una forma activa de *H-RAS* (G12V) en las células epiteliales mamarias HMLE o en las células MCF10A da lugar a la pérdida de características epiteliales y a la ganancia de propiedades mesenquimales, junto con un aumento de la población CD44<sup>hi</sup>/CD24<sup>-/low</sup> y la adquisición de una mayor invasividad<sup>203</sup>, sugiriendo un papel similar de ambos genes de la familia Ras en estos procesos. La expresión del gen *ERAS*, tanto el humano como el de ratón, en las células NIH/3T3 (una línea de fibroblastos de ratón) induce una morfología fusiforme, la pérdida de la inhibición por contacto y el crecimiento independiente de anclaje, dando lugar a la formación de tumores cuando se inyectan en ratones inmunodeficientes<sup>104</sup>. Asimismo, la expresión de *ERAS* llevó a un mayor crecimiento de los tumores generados a partir de las células MDA-MB-231 en ratones inmunodeficientes, promoviendo también su desdiferenciación y su capacidad metastásica, lo cual refuerza el

papel de *ERAS* como oncogén en las células epiteliales mamarias. Por otro lado, las células de los tumores de mama triple negativos y de tipo basal muestran patrones de expresión génica consistentes con el proceso de EMT, así como perfiles de expresión de marcadores de superficie similares a los de las células madre del cáncer de mama, con un fenotipo  $CD44^{hi}/CD24^{-/low}$  y la expresión de la aldehído deshidrogenasa. Sin embargo, aún no está claro si los tumores de mama de tipo basal o triple negativos están enriquecidos en células madre del cáncer o si las características de EMT y de célula madre se adquieren durante la progresión del desarrollo tumoral<sup>204</sup>. La expresión de *ERAS* en las células epiteliales mamarias tumorales podría conducir a un fenotipo semejante, favoreciendo el desarrollo de estos subtipos tumorales.

En los últimos años, las terapias basadas tanto en el silenciamiento como en la sobreexpresión de miARNs han emergido rápidamente, proporcionando posibles y prometedores tratamientos clínicos para varios tipos de cáncer resistentes a la quimioterapia convencional<sup>205,206</sup>. En las células MCF10A, *ERAS* indujo una disminución en los niveles de expresión de miR-205, miR-200c y miR-141, miARNs supresores tumorales cuya expresión reducida ha sido asociada con el desarrollo del cáncer de mama, estando implicados en el crecimiento celular, la migración, la invasión, la adquisición de características de células madre y el proceso de EMT<sup>138-143</sup>. Hemos demostrado que miR-200c juega un papel primordial en el proceso de EMT inducido tras la expresión de *ERAS*. La sobreexpresión de miR-200c en las células MCF10A-*ERAS* llevó a una reducción de los niveles de expresión de los factores de transcripción *ZEB1* y *ZEB2*, así como a una recuperación de la expresión de la cadherina-E y una disminución de la cadherina-N. Además, miR-200c revirtió la morfogénesis acinar aberrante de las células MCF10A-*ERAS*, recobrando la morfología esférica y ahuecada típica de las células MCF10A. Sin embargo, miR-141 solo fue capaz de revertir estos procesos parcialmente. Diversos estudios han demostrado que algunos tumores mamarios humanos, en especial los tumores triple negativos, muestran una disminución de los niveles de expresión de miR-200c, estando asociada con el desarrollo de metástasis regional a los nódulos linfáticos y con la resistencia a terapias endocrinas (como el tamoxifeno o el fulvestrant)<sup>207-209</sup>. Además, parece que esta disminución de los niveles de expresión de miR-200c en los tumores triple negativos se debe a un aumento en la metilación del locus miR-200c/miR-141, la cual podría estar mediada por *ZEB1*<sup>207,209</sup>. También se ha demostrado que miR-200c tiene efectos terapéuticos en un modelo *in vivo* de cáncer de mama de subtipo “*claudin-low*”, reduciendo la desdiferenciación y el crecimiento tumoral<sup>143</sup>. Nuestros resultados reafirman el papel de miR-200c en el proceso de EMT en las células epiteliales mamarias; sin embargo, sería de interés

elucidar los mecanismos a través de los cuales ERAS modula la expresión de estos miARNs, así como su papel en la proliferación, la migración y la adquisición de características de células madre en las células MCF10A.

En este trabajo, hemos confirmado que ERAS actúa a través de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR en las células epiteliales mamarias, tanto normales como tumorales, así como en los tumores originados tras la inyección de las células tumorales en ratones inmunodeficientes. La vía de PI3K/AKT/mTOR juega un papel crucial en múltiples procesos celulares, incluyendo la proliferación, el metabolismo y la supervivencia, es decir, eventos críticos en la transformación y la oncogénesis<sup>210</sup>. De hecho, esta vía de señalización está activada frecuentemente en el cáncer humano, incluyendo el cáncer de mama, donde ha sido implicada en la resistencia a terapias endocrinas y en las dirigidas contra la sobreexpresión de HER2; la combinación de dichas terapias con inhibidores de esta vía puede actuar de forma sinérgica en las células resistentes<sup>211,212</sup>. Por otro lado, algunos autores han reportado que la expresión de ERAS puede proporcionar resistencia a la quimioterapia en diferentes líneas celulares de cáncer humano (como el neuroblastoma<sup>136</sup>, el cáncer gástrico<sup>213</sup> o el melanoma<sup>137</sup>) mediada por la activación de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR, promoviendo la replicación del ADN y la transcripción. Inhibidores de PI3K (PD294002)<sup>136</sup>, AKT (MK2206)<sup>137</sup>, mTOR (rapamicina) o la topoisomerasa 1 (CPT-11)<sup>213</sup> han demostrado revertir la resistencia mediada por ERAS en estos tipos celulares.

De forma adicional, hemos mostrado que la expresión de ERAS resulta en la activación o represión de múltiples genes y vías de señalización, proporcionando diversas posibles dianas para el tratamiento de tumores que expresen este gen. Por ejemplo, hemos observado que ERAS induce un aumento en los niveles de expresión del receptor ROR1, el cual, curiosamente, se expresa durante el desarrollo embrionario y fetal, pero está ausente o muestra niveles reducidos de expresión en la mayoría de los tejidos adultos. No obstante, la sobreexpresión de este gen ha sido asociada con el desarrollo de tumores mamarios agresivos y con el subtipo triple negativo<sup>214,215</sup>. Además, ERAS lleva a la disminución de la expresión de las proteínas p63 y p73 (miembros de la familia p53), las cuales desempeñan un papel importante en el desarrollo normal y en la diferenciación de diferentes tejidos (incluida la glándula mamaria) y exhiben una compleja contribución a la tumorigénesis debida a la existencia de múltiples isoformas<sup>216,217</sup>. Los anticuerpos empleados para llevar a cabo las inmunofluorescencias en las células MCF10A no discriminan entre las varias isoformas de p63 o p73, por lo que no podemos descartar cambios en la composición de las isoformas de estas proteínas. Sin

embargo, un estudio reciente ha determinado que formas activas de los oncogenes *H-RAS* y *PIK3CA* inducen una fuerte represión de la isoforma de p63 predominante en las células basales de la glándula mamaria,  $\Delta Np63\alpha$ , dando lugar a la activación del proceso de EMT<sup>218</sup>. Por lo cual, el proceso de EMT inducido por ERAS podría estar mediado, al menos en parte, por la reducción en los niveles de expresión de estas proteínas.

En conclusión, hemos demostrado que la expresión del gen humano *ERAS* en células epiteliales mamarias no tumorales da lugar a una fuerte inducción del proceso de EMT, mediado al menos en parte por la disminución de miR-200c, y promueve la adquisición de características tumorales y de células madre. Además, hemos demostrado por primera vez que ERAS se expresa en algunos tumores de mama humanos, lo que podría estar mediado por alteraciones en la metilación. Por lo tanto, nuestros resultados son relevantes desde un punto de vista clínico y permiten ampliar el enfoque tanto pronóstico como terapéutico en estos tumores.

#### **4. -Ratones transgénicos K5-ERAS: un nuevo modelo para el estudio del cáncer de mama.**

Aunque existen muchas similitudes entre los diferentes miembros de la familia Ras, cada gen de esta familia posee características y funciones específicas, incluyendo su capacidad transformante en diferentes contextos celulares, su mutación preferente en ciertos tipos de tumor, así como distribución espacio-temporal en el organismo y su interacción con diferentes reguladores y efectores moleculares<sup>219</sup>. Dentro de esta familia, ERAS posee algunas características únicas, como: a) su extremo N-terminal de 38 aminoácidos, que desempeña un papel crítico en la señalización y localización de esta proteína; b) su alta afinidad de unión con PI3K y su baja afinidad por otros efectores, como RASSF5, RAF1, RaIGDS o PLC $\epsilon$ ; y c) su función constitutivamente activa, debido a que contiene una serina en lugar de una glicina en el residuo 50 (análogo al residuo 12 en H-, N- y K-RAS), siendo, por lo tanto, insensible a las proteínas Ras-GAP<sup>105</sup>. Por lo tanto, *ERAS* podría desempeñar funciones celulares diferentes al resto de miembros de la familia Ras, y el estudio de su papel *in vivo* podría mejorar el conocimiento de estas funciones.

Con el objetivo de estudiar el papel de ERAS *in vivo*, hemos generado por primera vez un modelo de ratón transgénico con expresión específica de tejido del gen humano *ERAS*, dirigiendo su expresión bajo los elementos reguladores de la queratina K5. Al igual que en los ratones K5-HRAS(G12V)<sup>220</sup>, la expresión elevada de *ERAS* parece ser deletérea, dando lugar a problemas de fertilidad y mortalidad prematura. Los ratones K5-ERAS presentan múltiples

alteraciones fenotípicas en diversos tejidos, incluyendo la glándula mamaria, la piel y el epitelio oral, así como alteraciones en el desarrollo de los anejos cutáneos o la coloración de los dientes.

Los incisivos de los ratones se caracterizan por poseer un color marrón-amarillento, debido al depósito de hierro en la capa superficial del esmalte. Sin embargo, los ratones K5-ERAS presentan una decoloración de los incisivos, siendo de un color blanquecino. De forma similar, los ratones nulos para el gen *Nrf2*, un gen involucrado en la respuesta al estrés oxidativo, también presentan esta alteración fenotípica debido a una deficiencia en el transporte del hierro durante el desarrollo del esmalte<sup>221</sup>. Por lo tanto, la expresión de ERAS podría estar interfiriendo en el transporte o en el depósito de hierro en el esmalte dental. Los ratones K5-ERAS podrían ser un buen modelo para estudiar la función de los ameloblastos y los procesos de formación del esmalte; sin embargo, no hemos profundizado en esta área.

La piel de los ratones K5-ERAS presenta una hiperplasia e hiperqueratosis generalizada de la epidermis, alteraciones en el desarrollo del pelo (con hiperplasia de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas), y un exceso de crecimiento (que lleva también a un aumento del tamaño de las orejas). Además, estos ratones desarrollan tumores cutáneos, observándose principalmente adenomas sebáceos y carcinomas de células escamosas. Estas observaciones son concordantes con otros modelos animales con sobreexpresión de moléculas implicadas en la vía de señalización de Ras, como AKT o IGF1, dirigidas por los elementos reguladores de la queratina K5. Los ratones K5-AKT, tanto la forma salvaje como la constitutivamente activa, comparten casi todas las características fenotípicas de la piel de los ratones K5-ERAS, al igual que los ratones K5-IGF1, en los cuales se observa un incremento en la activación de AKT. En general, estos modelos animales desarrollan papilomas y carcinomas de células escamosas, aumentando su penetrancia y su malignidad cuando se usan protocolos clásicos de carcinogénesis química<sup>222,223</sup>. Asimismo, los ratones K5-HRAS(G12V) también experimentan hiperplasia e hiperqueratosis de la epidermis, junto con severas alteraciones en los folículos pilosos, dando lugar a papilomas, carcinomas *in situ* y carcinomas de células escamosas desde edades muy tempranas<sup>220</sup>. Por otro lado, la delección de los tres principales miembros de la familia Ras (*H-*, *K-* y *N-RAS*) en las células positivas para la queratina K5 da lugar a un cese en la proliferación de la piel, induciéndose la senescencia sin señales de apoptosis. Este defecto en la proliferación es rescatado parcialmente cuando se activa constitutivamente la vía de señalización de las MAP quinasas<sup>224</sup>. La sobreexpresión de RasGRP1, una proteína con actividad Ras-GEF, en la piel de los ratones transgénicos K5-RasGRP1 no da lugar a cambios

histológicos distinguibles en la epidermis pero, sin embargo, favorece la aparición de tumores cutáneos (papilomas escamosos, principalmente)<sup>225</sup>. En su conjunto, estos datos indican el papel fundamental que desempeña la vía de señalización de Ras en el desarrollo de la epidermis y los anejos cutáneos, así como en el desarrollo de procesos tumorales. Si bien en condiciones normales *ERAS* se encontraría silenciado durante el desarrollo de la epidermis, su posible papel en procesos tumorales de la piel es desconocido.

Aunque algunos de estos modelos (como los ratones K5-AKT) también desarrollan tumores mamarios, estos presentan una incidencia muy reducida<sup>222</sup>. Sin embargo, los ratones K5-ERAS presentan alteraciones generalizadas en la glándula mamaria, mostrando hiperplasia y displasia de las células epiteliales y mioepiteliales, un aumento en el diámetro de los conductos mamarios y un incremento en el número de acinos desde el final de la pubertad hasta la gestación, así como un elevado número de tumores mamarios. El 54% de las hembras K5-ERAS desarrollaron tumores mamarios, con un ratio superior a 5,4 tumores por animal y una edad media de aparición de 7,6 meses de edad, indicando que las células epiteliales y/o mioepiteliales de la glándula mamaria son más susceptibles que las de otros tejidos (con células positivas a la queratina K5) a la generación de tumores tras la expresión de ERAS.

En la glándula mamaria del ratón, la expresión de la queratina K5 ocurre principalmente en las células basales mioepiteliales. Sin embargo, esta queratina también se expresa en células primitivas dentro de la jerarquía epitelial, incluyendo las células bipotentes que pueden generar células tanto de tipo luminal como de tipo basal<sup>14,226,227</sup>. En los ratones con transposición que desarrollaron tumores mamarios (a partir de los cuales se identificaron los genes estudiados en este trabajo), la transposasa se expresaba bajo los elementos reguladores de la queratina K5, indicando que las células que originaron dichos tumores expresaban o habían expresado previamente esta queratina. Sin embargo, estos animales no desarrollaron tumores mamarios mioepiteliales, por lo que, probablemente, estos tumores se originaron a partir de algún progenitor bipotente o multipotente. Curiosamente, los ratones K5-ERAS, que emplean el mismo promotor usado para dirigir la expresión de la transposasa, desarrollaron tumores mamarios con un fuerte componente mioepitelial, sugiriendo que a) estos tumores se originan a partir de células maduras y diferenciadas que no son propensas a la transformación por movilización de los transposones o b) la expresión de ERAS en células progenitoras reduce la diferenciación hacia células de tipo luminal. Por otro lado, los tumores originados como consecuencia de la transposición posiblemente necesitan acumular múltiples eventos mutagénicos a lo largo del tiempo para su desarrollo, por lo cual, la longevidad de las células progenitoras las convierte en probables dianas para una elevada adquisición de mutaciones



asociadas con la continua movilización de transposones mutagénicos en las células positivas para la queratina K5<sup>14</sup>. Sin embargo, parece que la expresión de ERAS como único evento inicial es suficiente para inducir alteraciones en el epitelio mamario, así como la subsecuente aparición de múltiples tumores. Estos hechos podrían explicar las diferencias histológicas de los tumores mamarios observadas en ambos modelos animales, a pesar de que en ambos casos los tumores se originan a partir de células positivas para la queratina K5. Dadas estas observaciones, sería interesante estudiar la expresión de ERAS bajo el control de otros promotores específicos de células lumbinales, como el 5'-LTR-MMTV o el promotor del gen *WAP*, lo cual permitiría evaluar el papel de ERAS en la diferenciación de las células lumbinales en un modelo *in vivo*, así como caracterizar los tumores mamarios generados a partir de este tipo celular.

Los tumores de mama desarrollados en los ratones K5-ERAS presentan un patrón papilar-tubular y un crecimiento intraductal multicéntrico, con células epiteliales muy atípicas pero con poco pleomorfismo, acompañadas por un abundante y desorganizado crecimiento mioepitelial y con diferentes grados de hialinización. Las células mioepiteliales presentan una marcada morfología fusiforme, dando lugar a la formación de cordones o masas sólidas que pueden comprimir y obliterar el epitelio glandular. Además, en algunos casos se puede observar metaplasia escamosa o sebácea derivada de las células epiteliales. Estos tumores presentan un crecimiento rápido y un carácter invasivo, destruyendo la membrana basal y colonizando el parénquima mamario. En definitiva, estos tumores se pueden clasificar como adenomioepiteliomas mamarios con un comportamiento biológico maligno. Histológicamente, estos tumores reproducen las características de los adenomioepiteliomas malignos humanos.

Los adenomioepiteliomas malignos son tumores poco frecuentes y con un comportamiento biológico poco conocido hasta el momento, lo que dificulta su diagnóstico certero y una adecuada evaluación de su pronóstico. Un adenomioepitelioma se considera maligno cuando cumple alguna de estas características: a) un ratio mitótico superior al 15%, b) una elevada atipia de las células neoplásicas y c) un patrón de crecimiento invasivo. Molecularmente, estos tumores se caracterizan por la expresión de  $\alpha$ -SMA en las células neoplásicas, las cuales también coexpresan queratinas con expresión basal en la glándula mamaria, como las queratinas K5 y K14, o el marcador de células basales p63. En estos tumores, las células cuboidales epiteliales que rodean al componente mioepitelial expresan las queratinas K8 y K18. Además, los adenomioepiteliomas malignos mamarios expresan vimentina, calponina y la proteína S100 en cantidades variables, siendo generalmente negativos para los receptores de

estrógenos y progesterona<sup>150,151,228</sup>. Como ya se ha destacado, los tumores mamarios de los ratones K5-ERAS muestran un comportamiento invasivo y, además, expresan algunos de los marcadores empleados para el diagnóstico de esta patología, como  $\alpha$ -SMA y la queratina K5 en las células mioepiteliales y la queratina K8 en las células epiteliales lumbinales, siendo negativos para el receptor de estrógenos. Aun así, sería de interés evaluar la expresión de otros marcadores como la proteína p63, el marcador de superficie CD10, c-kit (CD117), la calponina o la proteína S100. Hasta ahora, solo se ha descrito un modelo para el estudio del adenomioepitelioma en ratones, basado en el empleo de carcinogénesis química<sup>229</sup>. Tras tratar a ratones B6D2-F1 con DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antraceno) durante 4 semanas por vía oral, el 25% de los animales desarrollaron tumores mamarios, de los cuales el 70% eran adenomioepiteliomas.

En definitiva, los ratones K5-ERAS permiten estudiar el papel del gen *ERAS* en múltiples tejidos epiteliales, mejorando el conocimiento sobre los mecanismos y las vías moleculares que inducen las diferentes alteraciones tisulares, incluyendo el desarrollo de tumores. En concreto, estos ratones podrían constituir un nuevo modelo animal para el estudio del comportamiento biológico del adenomioepitelioma maligno, una patología humana poco estudiada.

## ***Conclusiones -***

---



## Conclusiones -

---

1. -En los tumores mamarios generados en los ratones con transposición, la integración del transposón en los genes *Rasa1* y *Nf1* lleva a la reducción de sus niveles de expresión, sugiriendo que actúan como genes supresores tumorales. Asimismo, la inserción del transposón en la región 5' del gen *Eras* se tradujo en su expresión aberrante en los tumores mamarios, indicando su posible papel como oncogén.
2. -La delección heterocigótica de *RASA1* asociada con la disminución de sus niveles de expresión, es un evento frecuente en los tumores de mama humanos, especialmente en los de subtipo basal y en los triple negativos, y correlaciona con mutaciones en el gen *TP53*.
3. -La reducción de los niveles de expresión de *RASA1* en las células epiteliales mamarias no tumorales MCF10A, junto con la expresión de la mutación R175H del gen *TP53*, induce la activación de la vía de señalización de Ras y el proceso de transición epitelio-mesénquima, resultando en un aumento de la invasividad de estas células.
4. -La expresión de ERAS en las células MCF10A da lugar a una morfología mesenquimal e impide la adecuada morfogénesis acinar en cultivos tridimensionales, induciendo características de célula madre y activando el proceso de transición epitelio-mesénquima; estos cambios están regulados, al menos en parte, por la reducción de los niveles de expresión de miR-200c. ERAS también modula múltiples vías de señalización, entre las que destaca la vía de PI3K/AKT/mTOR.
5. -La expresión de ERAS en las células tumorales mamarias MDA-MB-231 conduce a la formación de tumores de crecimiento más rápido y menos diferenciados tras su xenoinjerto en ratones inmunodeficientes FoxN1<sup>nu/nu</sup>, promoviendo además su capacidad metastásica.
6. -Algunos tumores de mama humanos expresan el gen *ERAS*, pudiendo estar relacionada esta expresión con los tumores de subtipo basal y con los tumores negativos para receptor de estrógenos. Esta activación de *ERAS* podría estar mediada por alteraciones epigenéticas.
7. -Los ratones transgénicos K5-ERAS expresan ERAS en las células basales de los epitelios estratificados, así como en las células mioepiteliales de las glándulas exocrinas, como la glándula mamaria. Por lo tanto, estos animales pueden ser usados para el estudio del papel de ERAS *in vivo* en estos tipos celulares.

8. -Los ratones transgénicos K5-ERAS presentan alteraciones en el desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad y la gestación, así como en su funcionalidad durante la lactación.
9. -Los ratones K5-ERAS desarrollan tumores de origen epitelial, como tumores cutáneos u orales, siendo especialmente susceptibles al desarrollo de tumores de la glándula mamaria, los cuales se caracterizan por un crecimiento rápido e invasivo independiente de estímulos hormonales.
10. Los tumores de mama de los ratones K5-ERAS presentan una morfología semejante a los adenomioepiteliomas malignos humanos, compartiendo incluso algunas características moleculares. Por lo tanto, este modelo animal podría emplearse para el estudio de esta patología humana.

En definitiva, las alteraciones de *ERAS* y *RASA1*, genes identificados como implicados en tumores mamarios en ratones mediante el uso del sistema "*sleeping beauty*", pueden favorecer o dar lugar a la aparición de tumores mamarios humanos, por lo que el estudio de sus alteraciones en pacientes puede ser importante desde un punto de vista terapéutico.



***Anexos -***

---



Nº tumor	Subtipo tumoral	Edad al diagnóstico (años)	Parámetros clínicos														Valoración IHQ			
			Estadaje TNM	Estadio	Grado	Tamaño	Metástasis a linfonodos	Estatus ESR1	Estatus PGR	Estatus HER2	Estatus KI-67	Estatus TP53	Recurrencia	Menopausia	Muerte	Supervivencia global	RASA1	NF1	TP53	p-ERK
1	Triple negativo	38	T3N1MX	IIIA	G3	T3 (6cm)	+	-	-	-	+	-	No	No	No	N/A	1	4	0	0
2	Triple negativo	53	T1cN0M0	IIA	G3	T1c (2cm)	-	-	-	-	+	ND	No	No	No	N/A	0	2	1	1
3	HER2	70	T1cN0M0	I	G2	T1c (1,4cm)	-	-	-	+	+	-	No	Si	No	N/A	1	2,6	0	0
4	HER2	59	T1cN1M0	IIB	G3	T1c	+	-	-	+	+	+	No	ND	No	N/A	1	1	1	1
5	HER2	62	T2N0M0	II	G3	T2 (5cm)	-	-	-	+	+	+	Si	Si	No	N/A	3	4	1	0
6	HER2	89	T4bNXMX	IIB	G3	T3 (9cm)	ND	-	-	+	+	ND	No	Si	No	N/A	1	3,5	0	0
7	Luminal A	46	T2cNmicM0	IIA	G1	T2	+	+	+	-	-	-	No	Pre	No	N/A	2	3,5	0	0
8	Luminal A	46	T1cNmicM0	I	G1	T1 (1,8cm)	+	+	+	-	-	-	No	Pre	No	N/A	3	3	0	0
9	Luminal A	46	T1cNmicM0	I	G1	T1 (1,5cm)	+	+	+	-	-	-	No	Pre	No	N/A	2	1	0	0
10	Luminal A	46	T1cNmicM0	I	G1	T1 (1,2cm)	+	+	+	-	-	-	No	Pre	No	N/A	3	3	0	1
11	Luminal A	58	T4N2M0	IIIB	G2	T4 (0,4cm)	+	+	+	-	-	-	No	Si	No	N/A	1	2	0	0
12	Luminal B	62	T4N2M0	IIIB	G3	T4 (3cm)	+	+	+	-	+	-	No	Si	No	N/A	1	2	0	0
13	Luminal B	41	T1cN1M0	IIA	G1	T1c (2cm)	+	+	+	-	+	-	No	No	No	N/A	2	3,5	0	0
14	Luminal B	81	T1cN1M0	IIA	G2	T1c (1,6cm)	+	+	+	-	+	-	No	Si	No	N/A	2	3	0	0
15	Luminal B	78	T2N2M0	IIIA	G3	T2 (3cm)	+	+	+	-	+	-	No	Si	No	N/A	1	2,5	0	0
16	Luminal B	43	T1cN0M0	I	G3	T1c (1,6cm)	-	+	+	-	+	-	No	Pre	No	N/A	1	2,5	0	0
17	Luminal B HER2	83	T2N0M0	IIIC	G2	T2 (2,5cm)	+	+	+	+	+	-	No	Si	No	N/A	2	2	0	0
18	Luminal B HER2	76	T1cN0MX	IIA	G3	T1c (2cm)	-	+	-	+	+	-	No	Si	No	N/A	3	2	0	0
19	Luminal B HER2	39	T2N1M0	IIB	G1	T2 (4cm)	+	+	+	+	+	-	No	No	No	N/A	2	3	0	0
20	Luminal B HER2	67	T1cN0M0	I	G3	T1c (1,7cm)	-	+	-	+	+	-	No	Si	No	N/A	2	ND	0	0
21	Luminal B HER2	59	T1cN0MX	I	G2	T1c (1,2cm)	-	+	+	+	+	-	No	Si	No	N/A	2	2	0	0
22	Luminal B	66	T1bN0M0	I	G3	T1b (0,7cm)	-	+	-	-	+	+	No	Si	No	N/A	2	2	1	0
23	Triple negativo	83	T4aN3M0	IIIC	G3	T4a (5cm)	+	-	-	-	+	+	Si	Si	Si	24 meses	0	3	1	1
24	Triple negativo	87	T4aN0M0	IIIB	G3	T4a	-	-	-	-	-	-	No	Si	Si	5 meses	1	1,5	0	0
25	Triple negativo	71	T3N0MX	IIB	G3	T3	-	-	-	-	+	+	ND	Si	No	N/A	1	2,7	1	0
26	Triple negativo	50	T4bN3M0	IIIC	G3	T4b	+	-	-	-	+	-	Si	Pre	Si	19 meses	1	1,5	0	0
27	Triple negativo	50	T4bN3M0	IIC	G3	T4 (16cm)	+	-	-	-	+	-	Si	Pre	Si	19 meses	2	3	0	0
28	Triple negativo	67	T1cN0M0	IIA	G3	T1c	-	-	-	-	+	-	No	Si	No	N/A	2	2,5	0	0
29	Triple negativo	77	T2N0M0	IIA	G3	T2 (3cm)	-	-	-	-	+	+	Si	Pre	No	N/A	0	1	1	0
30	Triple negativo	38	T2N0M0	IIA	G3	T2 (3cm)	-	-	-	-	+	+	Si	Pre	Si	27 meses	1	2,5	1	0
31	Triple negativo	33	T3NXMX	IIB	G3	T3 (9cm)	ND	-	-	-	+	-	Si	Pre	ND	ND	1	1	0	1
32	Triple negativo	33	T1cN1MX	IIA	G3	T1c	+	-	-	-	+	-	Si	Pre	ND	ND	0	1	0	1

#### Anexo I. Parámetros clínicos y valoraciones de tinciones inmunohistoquímicas de las muestras de tumores de mama humanos.

N/A = No Aplica; ND = No Determinado; Pre = premenopausia.

Inducidos		Reprimidos	
Gen	Expresión relativa	Gen	Expresión relativa
SERPINE1	17,61	DSG3	-66,8
SRGN	15,95	MIR205	-61,37
FN1	15,68	CLCA2	-50,61
ANKRD1	14,06	LOC647859	-37,36
COL12A1	14,02	DSC3	-34,06
HAS2	12,79	KRT14	-23,83
PAPPA	12,37	CLDN1	-22,12
MAP2	9,81	FGFBP1	-21,45
PLOD2	9,7	IRF6	-21,09
FBN1	9,69	S100A14	-17,27
CYR61	9,26	RNA5SP496	-15,95
TGM2	8,86	CSTA	-14,89
PTPRJ	8,6	DSC2	-13,52
LOC152742	8,24	PNLIPRP3	-13,5
OTTHUMG00000159416	8,05	KRT17	-13,47
TGFB2	7,52	CDH1	-13,39
MYPN	7,44	FAM213A	-12,45
PLCB4	7,39	FLRT3	-11,42
S1PR3	7,25	ABCA12	-11,4
COL8A1	6,89	CKMT1A	-11,38
STC1	6,69	KRT17P2	-11,36
MAP1B	6,37	ESRP1	-10,68
STEAP4	6,22	KRT17P1	-10,62
PRR5L	6,22	FAM83B	-10,12
OTTHUMG00000162028	6,09	OCLN	-9,34
SVEP1	5,81	FXYD3	-8,9
CXCL1	5,78	KRT10	-8,69
CA9	5,43	CDH3	-8,67
CDH2	5,42	C1orf116	-8,51
TRAM2	5,28	CKMT1B	-8,2
NAV1	5,15	GLUL	-7,97
ELL2	5,01	TP63	-7,97
WNT5A	4,99	TGM1	-7,7
ANGPTL4	4,97	MPZL2	-7,31
CCDC80	4,94	TSPAN1	-7,17
FSTL1	4,86	PRR15L	-6,24
CCBE1	4,78	SERPINB13	-6,06
IRS1	4,77	SLPI	-5,74
KDELR3	4,72	CLDN7	-5,62
MCAM	4,71	SPRR1B	-5,47
THBS1	4,67	PLXDC2	-5,05
AREG	4,65	ITGA2	-5,01
AREG	4,61	POF1B	-4,91
BNIP3P1	4,44	S100A2	-4,86
OTTHUMG00000157236	4,41	SCNN1G	-4,86
FPR1	4,33	PPP1R14C	-4,85
ITGA5	4,31	GALNT3	-4,8
TMEM2	4,26	SERPINA3	-4,74
CPA4	4,24	SOX15	-4,74
PLAC8	4,14	CDS1	-4,73
ZFP36L1	4,01	GPR87	-4,69
CENPE	3,97	ARHGDI1B	-4,68
QSOX1	3,96	KRT16	-4,39
HEG1	3,94	SFN	-4,37
ANPEP	3,94	MYO1D	-4,35
ANXA6	3,72	KLK7	-4,35
BNIP3	3,67	KRT15	-4,31
PAPSS2	3,64	KRT16P2	-4,29
MYL9	3,62	PERP	-4,28
F3	3,61	MIR141	-4,28
RNF24	3,54	DSP	-4,21
IGFBP3	3,49	ETS2	-4,19
HIPK2	3,48	SLC16A4	-3,97
ASAP1	3,44	MIR936	-3,92
AOX1	3,41	GJB5	-3,9
NPIP11	3,4	PLEKHA5	-3,88
POLR2A	3,4	MAL2	-3,84
DCBLD1	3,32	PRRG4	-3,81
FLVCR2	3,31	ITGA6	-3,8

Anexo II. Expresión relativa de los principales genes inducidos y reprimidos en las células MCF10A-ERAS con respecto a las células control. Los análisis de expresión génica se realizaron utilizando los "microarrays" de ADN HTA 2.0. Affymetrix.

Línea L1					
Ambos sexos n= 48	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	18	>80	37,5	>4,4	64,5
Tumores cutáneos	27	31	56,3	1,1	25,0
Tumores orales	8	8	16,7	1,0	6,5
Tumores tímicos	2	2	4,2	1,0	1,6
Otros	3	3	6,3	1,0	2,4
Total	35	>124	72,9	>3,5	100,0
Hembras n= 32	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	18	>80	56,3	>4,4	83,3
Tumores cutáneos	13	14	40,6	1,1	14,6
Tumores orales	1	1	3,1	1,0	1,0
Tumores tímicos	1	1	3,1	1,0	1,0
Otros	0	0	0,0	0,0	0,0
Total	23	>96	71,9	>4,6	100,0
Machos n= 16	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	0	0	0,0	0,0	0,0
Tumores cutáneos	14	17	87,5	1,2	60,7
Tumores orales	7	7	43,8	1,0	25,0
Tumores tímicos	1	1	6,3	1,0	3,6
Otros	3	3	18,8	1,0	10,7
Total	12	28	75,0	2,3	100,0
Línea L2					
Ambos sexos n= 29	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	2	>20	6,9	>10	80,0
Tumores cutáneos	2	2	6,9	1,0	8,0
Tumores orales	2	2	6,9	1,0	8,0
Tumores tímicos	0	0	0,0	0,0	0,0
Otros	1	1	3,4	1,0	4,0
Total	7	>25	24,1	>3,6	100,0
Hembras n= 10	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	2	>20	20,0	>10	95,2
Tumores cutáneos	1	1	10,0	1,0	4,8
Tumores orales	0	0	0,0	0,0	0,0
Tumores tímicos	0	0	0,0	0,0	0,0
Otros	0	0	0,0	0,0	0,0
Total	3	>21	30,0	>7	100,0
Machos n= 19	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	0	0	0,0	0,0	0,0
Tumores cutáneos	1	1	5,3	1,0	25,0
Tumores orales	2	2	10,5	1,0	50,0
Tumores tímicos	0	0	0,0	0,0	0,0
Otros	1	1	5,3	1,0	25,0
Total	4	4	21,1	1,0	100,0

Línea L3					
Ambos sexos n= 20	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	7	>45	35,0	>6,4	80,4
Tumores cutáneos	6	9	30,0	1,5	16,1
Tumores orales	1	1	5,0	1,0	1,8
Tumores tímicos	1	1	5,0	1,0	1,8
Otros	0	0	0,0	0,0	0,0
Total	10	>56	50,0	>5,6	100,0
Hembras n= 8	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	7	>45	87,5	>6,4	86,5
Tumores cutáneos	3	5	37,5	1,7	9,6
Tumores orales	1	1	12,5	1,0	1,9
Tumores tímicos	1	1	12,5	1,0	1,9
Otros	0	0	0,0	0,0	0,0
Total	7	>52	87,5	>7,4	100,0
Machos n= 12	Nº animales	Nº tumores	% animales con tumor	Ratio tumor/animal	% de tipo tumoral
Tumores mamarios	0	0	0,0	0,0	0,0
Tumores cutáneos	3	4	25,0	1,3	100,0
Tumores orales	0	0	0,0	0,0	0,0
Tumores tímicos	0	0	0,0	0,0	0,0
Otros	0	0	0,0	0,0	0,0
Total	3	4	25,0	1,3	100,0

**Anexo III. Recuento del número de tumores epiteliales en cada una de las tres líneas de ratones K5-ERAS.** Se muestra el número de animales que desarrolló cada tipo tumoral, el número de tumores, así como el porcentaje de animales con tumor, el ratio tumor/animal y el porcentaje de cada tipo tumoral teniendo en cuenta ambos sexos a la vez y por separado. El número total de animales empleado en cada estudio se muestra en la casilla superior izquierda de cada tabla.



## ***Referencias -***

---



## Referencias -

---

1. - Hassiotou, F. & Geddes, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin. Anat.* **26**, 29–48 (2013).
2. - Macias, H. & Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **1**, 533–557 (2013).
3. - Inman, J. L., Robertson, C., Mott, J. D. & Bissell, M. J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* **142**, 1028–1042 (2015).
4. - Watson, C. J. & Khaled, W. T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* **135**, 995–1003 (2008).
5. - Oakes, S. R., Hilton, H. N. & Ormandy, C. J. The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Res.* **8**, 207 (2006).
6. - Akhtar, N. *et al.* Rac1 Controls Both the Secretory Function of the Mammary Gland and Its Remodeling for Successive Gestations. *Dev. Cell* **38**, 522–535 (2016).
7. - Treuting, P. M. & Dintzis, S. M. in *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* 46–51 (2012).
8. - Gudjonsson, T., Adriance, M. C., Sternlicht, M. D., Petersen, O. W. & Bissell, M. J. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **10**, 261–72 (2005).
9. - Chu, P. G. & Weiss, L. M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* **40**, 403–39 (2002).
10. - Sun, P., Yuan, Y., Li, A., Li, B. & Dai, X. Cytokeratin expression during mouse embryonic and early postnatal mammary gland development. *Histochem. Cell Biol.* **133**, 213–21 (2010).
11. - Santagata, S. *et al.* Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome. *J. Clin. Invest.* **124**, 859–870 (2014).
12. - Visvader, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev.* **23**, 2563–2577 (2009).
13. - Petersen, O. W. & Polyak, K. Stem Cells in the Human Breast. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003160–a003160 (2010).
14. - Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* **506**, (2014).
15. - Taddei, I. *et al.* Beta1 integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat. Cell Biol.* **10**, 716–22 (2008).
16. - Eirew, P. *et al.* A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability. *Nat. Med.* **14**, 1384–1389 (2008).

17. - Tiede, B. & Kang, Y. From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. *Cell Res.* **21**, 245–257 (2011).
18. - Lim, E. *et al.* Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res.* **12**, R21 (2010).
19. - Owens, T. W. & Naylor, M. J. Breast cancer stem cells. *Front. Physiol.* **4**, 225 (2013).
20. - Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–8 (2003).
21. - Sarrio, D., Franklin, C. K., Mackay, A., Reis-Filho, J. S. & Isacke, C. M. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells* **30**, 292–303 (2012).
22. - Ginestier, C. *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–67 (2007).
23. - Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. cancer* **136**, E359-86 (2015).
24. - McGuire, A., Brown, J., Malone, C., McLaughlin, R. & Kerin, M. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **7**, 908–929 (2015).
25. - Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* **117**, 3155–63 (2007).
26. - Weigelt, B., Peterse, J. L. & van't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602 (2005).
27. - Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 955–60 (2010).
28. - Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–52 (2000).
29. - Sørli, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–74 (2001).
30. - Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–23 (2003).
31. - Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, R76 (2007).
32. - Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).
33. - Prat, A. & Perou, C. M. Mammary development meets cancer genomics. *Nat. Med.* **15**, 842–844 (2009).
34. - Parker, J. S. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).

35. - Nielsen, T. *et al.* Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens. *BMC Cancer* **14**, 177 (2014).
36. - Dunnwald, L. K., Rossing, M. A. & Li, C. I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **9**, R6 (2007).
37. - Ciruelos, E. *et al.* The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *The Breast* **23**, 201–208 (2014).
38. - Slamon, D. J. *et al.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707–12 (1989).
39. - Andrechek, E. R. *et al.* Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3444–9 (2000).
40. - Gajria, D. & Chandarlapaty, S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **11**, 263–75 (2011).
41. - Ross, J. S., Hatzis, C., Symmans, W. F., Pusztai, L. & Hortobagyi, G. N. Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast Cancer. *Oncologist* **13**, 477–493 (2008).
42. - Shah, S. P. *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* **486**, 395 (2012).
43. - Curtis, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–52 (2012).
44. - Dawson, S.-J., Rueda, O. M., Aparicio, S. & Caldas, C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J.* **32**, 617–628 (2013).
45. - Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
46. - Nik-Zainal, S. *et al.* Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 47–54 (2016).
47. - Ciriello, G. *et al.* Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell* **163**, 506–19 (2015).
48. - Ford, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 676–89 (1998).
49. - Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–90 (2009).
50. - Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–15 (2008).
51. - Rai, H. & Ahmed, J. N-cadherin: a marker of epithelial to mesenchymal transition in tumor progression. *Internet J. Oncol.* **10**, 1–12 (2014).

52. - Kalluri, R. & Weinberg, R. a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
53. - Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* **5**, 1122–1143 (2015).
54. - Zhu, J. *et al.* Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Front. Genet.* **5**, 149 (2014).
55. - van Schooneveld, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res.* **17**, 21 (2015).
56. - Blenkiron, C. *et al.* MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* **8**, R214 (2007).
57. - Kuperwasser, C. *et al.* Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4966–71 (2004).
58. - Manning, H. C., Buck, J. R. & Cook, R. S. Mouse Models of Breast Cancer: Platforms for Discovering Precision Imaging Diagnostics and Future Cancer Medicine. *J. Nucl. Med.* **57 Suppl 1**, 60S–8S (2016).
59. - DeRose, Y. S. *et al.* Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat. Med.* **17**, 1514–20 (2011).
60. - DeRose, Y. S. *et al.* Patient-derived models of human breast cancer: protocols for in vitro and in vivo applications in tumor biology and translational medicine. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **Chapter 14**, Unit14.23 (2013).
61. - Borowsky, A. D. Choosing a mouse model: experimental biology in context--the utility and limitations of mouse models of breast cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a009670 (2011).
62. - Hennighausen, L. Mouse models for breast cancer. *Oncogene* **19**, 966–967 (2000).
63. - Hennighausen, L. Mouse models for breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2**, 2–7 (2000).
64. - Hutchinson, J. N. & Muller, W. J. Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* **19**, 6130–7 (2000).
65. - Teulière, J. *et al.* Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**, 267–77 (2005).
66. - Gu, B. *et al.* Pygo2 expands mammary progenitor cells by facilitating histone H3 K4 methylation. *J. Cell Biol.* **185**, 811–26 (2009).
67. - Derksen, P. W. B. *et al.* Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* **10**, 437–449 (2006).
68. - Ryding, A. D. S., Sharp, F. & Mullins, J. J. Conditional transgenic technologies. *J. Endocrinol.* **171**, 1–14 (2001).



69. - Wagner, K. U. *et al.* Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res.* **10**, 545–53 (2001).
70. - Annunziato, S. *et al.* Modeling invasive lobular breast carcinoma by CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing of the mammary gland. *Genes Dev.* **30**, 1470–80 (2016).
71. - Cardiff, R. D. Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 224–30 (2001).
72. - Pfefferle, A. D. *et al.* Transcriptomic classification of genetically engineered mouse models of breast cancer identifies human subtype counterparts. *Genome Biol.* **14**, R125 (2013).
73. - Hollern, D. P. & Andrechek, E. R. A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. *Breast Cancer Res.* **16**, R59 (2014).
74. - Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R. M., Jenkins, N. A. & Copeland, N. G. RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D523–7 (2004).
75. - Wang, G. *et al.* Apical barriers to airway epithelial cell gene transfer with amphotropic retroviral vectors. *Gene Ther.* **9**, 922–31 (2002).
76. - Yamashita, M. & Emerman, M. Retroviral infection of non-dividing cells: Old and new perspectives. *Virology* **344**, 88–93 (2006).
77. - DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Adams, D. J. & Wong, C. C. The utility of transposon mutagenesis for cancer studies in the era of genome editing. *Genome Biol.* **16**, 229 (2015).
78. - Geurts, A. M. *et al.* Gene Transfer into Genomes of Human Cells by the Sleeping Beauty Transposon System. *Mol. Ther. Publ. online 01 July 2003*; | doi10.1016/S1525-0016(03)00099-6 **8**, 108 (2003).
79. - Largaespada, D. A. & Collier, L. S. Transposon-mediated mutagenesis in somatic cells: identification of transposon-genomic DNA junctions. *Methods Mol. Biol.* **435**, 95–108 (2008).
80. - Quintana, R. M. *et al.* A transposon-based analysis of gene mutations related to skin cancer development. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 239–48 (2013).
81. - Banerji, S. *et al.* Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* **486**, 405–9 (2012).
82. - Persson, M. *et al.* Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18740–18744 (2009).
83. - Tufegdzcic Vidakovic, A. *et al.* Context-Specific Effects of TGF- $\beta$ /SMAD3 in Cancer Are Modulated by the Epigenome. *Cell Rep.* **13**, 2480–90 (2015).
84. - Craig, D. W. *et al.* Genome and Transcriptome Sequencing in Prospective Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Uncovers Therapeutic Vulnerabilities. *Mol. Cancer Ther.*

- 12**, 104–116 (2013).
85. - Ligeti, E., Welte, S. & Scheffzek, K. Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol. Rev.* **92**, 237–72 (2012).
86. - Cox, A. D. & Der, C. J. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **1**, 2–27 (2010).
87. - Boyd, K. P., Korf, B. R. & Theos, A. Neurofibromatosis type 1. *J. Am. Acad. Dermatol.* **61**, 1-14–6 (2009).
88. - Da Silva, A. V., Rodrigues, F. R., Pureza, M., Lopes, V. G. S. & Cunha, K. S. Breast cancer and neurofibromatosis type 1: a diagnostic challenge in patients with a high number of neurofibromas. *BMC Cancer* **15**, 183 (2015).
89. - Wang, X. *et al.* Breast cancer and other neoplasms in women with neurofibromatosis type 1: A retrospective review of cases in the Detroit metropolitan area. *Am. J. Med. Genet. Part A* **158A**, 3061–3064 (2012).
90. - McGillicuddy, L. T. *et al.* Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell* **16**, 44–54 (2009).
91. - Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–63 (2012).
92. - Bell, D. *et al.* Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609–615 (2011).
93. - Boudry-Labis, E. *et al.* Neurofibromatosis-1 gene deletions and mutations in de novo adult acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* **88**, 306–311 (2013).
94. - Wallace, M. D. *et al.* Comparative Oncogenomics Implicates the Neurofibromin 1 Gene (NF1) as a Breast Cancer Driver. *Genetics* **192**, 385–396 (2012).
95. - Pamonsinlapatham, P. *et al.* P120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): A multi-interacting protein in downstream signaling. *Biochimie* **91**, 320–328 (2009).
96. - Organ, S. L. *et al.* p120RasGAP Is a Mediator of Rho Pathway Activation and Tumorigenicity in the DLD1 Colorectal Cancer Cell Line. *PLoS One* **9**, e86103 (2014).
97. - Yang, X.-Y. *et al.* p120Ras-GAP binds the DLC1 Rho-GAP tumor suppressor protein and inhibits its RhoA GTPase and growth-suppressing activities. *Oncogene* **28**, 1401–1409 (2009).
98. - Henkemeyer, M. *et al.* Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* **377**, 695–701 (1995).
99. - Eerola, I. *et al.* Capillary Malformation–Arteriovenous Malformation, a New Clinical and Genetic Disorder Caused by RASA1 Mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 1240–1249 (2003).
100. - Boon, L. M., Mulliken, J. B. & Viskula, M. RASA1: variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 265–269 (2005).
101. - Friedman, E., Gejman, P. V., Martin, G. A. & McCormick, F. Nonsense mutations in the C-terminal SH2 region of the GTPase activating protein (GAP) gene in human tumours. *Nat. Genet.* **5**, 242–7 (1993).

102. Sun, D. *et al.* MicroRNA-31 Activates the RAS Pathway and Functions as an Oncogenic MicroRNA in Human Colorectal Cancer by Repressing RAS p21 GTPase Activating Protein 1 (RASA1). *J. Biol. Chem.* **288**, 9508–9518 (2013).
103. Berndt, S. I. *et al.* Two susceptibility loci identified for prostate cancer aggressiveness. *Nat. Commun.* **6**, 6889 (2015).
104. Takahashi, K., Mitsui, K. & Yamanaka, S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* **423**, 541–5 (2003).
105. Nakhaei-Rad, S. *et al.* The Function of Embryonic Stem Cell-expressed RAS (E-RAS), a Unique RAS Family Member, Correlates with Its Additional Motifs and Its Structural Properties. *J. Biol. Chem.* **290**, 15892–15903 (2015).
106. Zhao, Z.-A. *et al.* The roles of ERAS during cell lineage specification of mouse early embryonic development. *Open Biol.* **5**, 150092 (2015).
107. Kaizaki, R. *et al.* Expression of ERas oncogene in gastric carcinoma. *Anticancer Res.* **29**, 2189–93 (2009).
108. Kubota, E. *et al.* Role of ES cell-expressed Ras (ERas) in tumorigenicity of gastric cancer. *Am. J. Pathol.* **177**, 955–63 (2010).
109. Debnath, J., Muthuswamy, S. K. & Brugge, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**, 256–268 (2003).
110. Min, J. *et al.* An oncogene–tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor- $\kappa$ B. *Nat. Med.* **16**, 286–294 (2010).
111. Kunath, T. *et al.* Transgenic RNA interference in ES cell–derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat. Biotechnol.* **21**, 559–561 (2003).
112. Ruiz, S. *et al.* Generation of a drug-inducible reporter system to study cell reprogramming in human cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 40767–78 (2012).
113. Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193–9 (1991).
114. Rodriguez LG, Wu X, G. J. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol.* 23–9 (2005).
115. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–50 (2004).
116. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 34–1 (2002).
117. Chen, J., Bardes, E. E., Aronow, B. J. & Jegga, A. G. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* **37**, W305–W311 (2009).
118. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550

- (2005).
119. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **6**, pl1 (2013).
  120. Beroukhi, R. *et al.* Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and application to glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20007–20012 (2007).
  121. Ringnér, M., Fredlund, E., Häkkinen, J., Borg, Å. & Staaf, J. GOBO: Gene Expression-Based Outcome for Breast Cancer Online. *PLoS One* **6**, e17911 (2011).
  122. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. & Lacy, E. *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1994).
  123. Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–17 (1975).
  124. Collier, L. S. & Largaespada, D. A. Hopping around the tumor genome: transposons for cancer gene discovery. *Cancer Res.* **65**, 9607–10 (2005).
  125. Soule, H. D. *et al.* Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50**, 6075–86 (1990).
  126. Worsham, M. J. *et al.* High-resolution mapping of molecular events associated with immortalization, transformation, and progression to breast cancer in the MCF10 model. *Breast Cancer Res. Treat.* **96**, 177–186 (2006).
  127. Sarrió, D. *et al.* Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Relates to the Basal-like Phenotype. *Cancer Res.* **68**, (2008).
  128. Soussi, T. & Wiman, K. G. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ.* **22**, 1239–1249 (2015).
  129. Liu, S. *et al.* Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* **2**, 78–91 (2014).
  130. Taube, J. H. *et al.* Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15449–54 (2010).
  131. Takahashi, K., Nakagawa, M., Young, S. G. & Yamanaka, S. Differential membrane localization of ERas and Rheb, two Ras-related proteins involved in the phosphatidylinositol 3-kinase/mTOR pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 32768–74 (2005).
  132. Debnath, J. *et al.* The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* **111**, 29–40 (2002).
  133. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* **69**, 4116–24 (2009).
  134. Dontu, G. *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* **17**, 1253–70 (2003).
  135. Ponti, D. *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* **65**, 5506–11 (2005).

136. Aoyama, M., Kataoka, H., Kubota, E., Tada, T. & Asai, K. Resistance to chemotherapeutic agents and promotion of transforming activity mediated by embryonic stem cell-expressed Ras (ERas) signal in neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* **37**, 1011–6 (2010).
137. Perna, D. *et al.* BRAF inhibitor resistance mediated by the AKT pathway in an oncogenic BRAF mouse melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E536–45 (2015).
138. Piovan, C. *et al.* Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. *Mol. Oncol.* **6**, 458–72 (2012).
139. Wu, H., Zhu, S. & Mo, Y.-Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res.* **19**, 439–448 (2009).
140. Perdigão-Henriques, R. *et al.* miR-200 promotes the mesenchymal to epithelial transition by suppressing multiple members of the Zeb2 and Snail1 transcriptional repressor complexes. *Oncogene* **35**, 158–72 (2016).
141. Feng, Z.-M. *et al.* Essential role of miR-200c in regulating self-renewal of breast cancer stem cells and their counterparts of mammary epithelium. *BMC Cancer* **15**, 645 (2015).
142. Castilla, M. Á. *et al.* MicroRNA-200 Family Modulation in Distinct Breast Cancer Phenotypes. *PLoS One* **7**, e47709 (2012).
143. Knezevic, J. *et al.* Expression of miR-200c in claudin-low breast cancer alters stem cell functionality, enhances chemosensitivity and reduces metastatic potential. *Oncogene* **34**, 5997–6006 (2015).
144. Moriya, T. *et al.* New trends of immunohistochemistry for making differential diagnosis of breast lesions. *Med. Mol. Morphol.* **39**, 8–13 (2006).
145. Yashiro, M. *et al.* Epigenetic regulation of the embryonic oncogene ERas in gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* **35**, 997–1003 (2009).
146. Rahrmann, E. P. *et al.* Forward genetic screen for malignant peripheral nerve sheath tumor formation identifies new genes and pathways driving tumorigenesis. *Nat. Genet.* **45**, 756–66 (2013).
147. Nakhaei-Rad, S. *et al.* The Role of Embryonic Stem Cell-expressed RAS (ERAS) in the Maintenance of Quiescent Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 8399–413 (2016).
148. Ramírez, A., Bravo, A., Jorcano, J. L. & Vidal, M. Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* **58**, 53–64 (1994).
149. Sternlicht, M. D., Kouroos-Mehr, H., Lu, P. & Werb, Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* **74**, 365–381 (2006).
150. Tavassoli, F. A. *et al.* Myoepithelial Lesions of the Breast. *Am. J. Surg. Pathol.* **15**, 554–568 (1991).
151. Yoon, J. Y. & Chitale, D. Adenomyoepithelioma of the Breast: A Brief Diagnostic Review. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **137**, 725–729 (2013).
152. Yant, S. R. *et al.* High-Resolution Genome-Wide Mapping of Transposon Integration in Mammals. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2085–2094 (2005).

153. Liang, Q., Kong, J., Stalker, J. & Bradley, A. Chromosomal mobilization and reintegration of *Sleeping Beauty* and *PiggyBac* transposons. *genesis* **47**, 404–408 (2009).
154. Dupuy, A. J., Akagi, K., Largaespada, D. A., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature* **436**, 221–6 (2005).
155. Collier, L. S., Carlson, C. M., Ravimohan, S., Dupuy, A. J. & Largaespada, D. A. Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse. *Nature* **436**, 272–276 (2005).
156. Shah, S. P. *et al.* The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* **486**, 395–9 (2012).
157. Liu, J. C. *et al.* Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1542–1560 (2014).
158. Rangel, R. *et al.* Transposon mutagenesis identifies genes that cooperate with mutant Pten in breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E7749–E7758 (2016).
159. Collier, L. S. *et al.* Whole-Body Sleeping Beauty Mutagenesis Can Cause Penetrant Leukemia/Lymphoma and Rare High-Grade Glioma without Associated Embryonic Lethality. *Cancer Res* **69**, 8429–37 (2009).
160. Moriarity, B. S. *et al.* A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis. *Nat. Genet.* **47**, 615–24 (2015).
161. Mumert, M. *et al.* Functional genomics identifies drivers of medulloblastoma dissemination. *Cancer Res.* **72**, 4944–53 (2012).
162. Uren, A. G. *et al.* Large-Scale Mutagenesis in p19ARF- and p53-Deficient Mice Identifies Cancer Genes and Their Collaborative Networks. *Cell* **133**, 727–741 (2008).
163. Koudijs, M. J. *et al.* High-throughput semiquantitative analysis of insertional mutations in heterogeneous tumors. *Genome Res.* **21**, 2181–9 (2011).
164. Giltneane, J. M. & Balko, J. M. Rationale for Targeting the Ras/MAPK Pathway in Triple-Negative Breast Cancer. *Discov. Med.* **17**, 275–283 (2014).
165. Hoeflich, K. P. *et al.* In vivo Antitumor Activity of MEK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors in Basal-Like Breast Cancer Models. *Clin. Cancer Res.* **15**, (2009).
166. Mirzoeva, O. K. *et al.* Basal Subtype and MAPK/ERK Kinase (MEK)-Phosphoinositide 3-Kinase Feedback Signaling Determine Susceptibility of Breast Cancer Cells to MEK Inhibition. *Cancer Res.* **69**, 565–572 (2009).
167. Nguyen, L. V. *et al.* Barcoding reveals complex clonal dynamics of de novo transformed human mammary cells. *Nature* **528**, 267–271 (2015).
168. Menezes, M. E. *et al.* in *Advances in cancer research* **121**, 331–382 (2014).
169. Bernards, A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **1603**, 47–82 (2003).



170. Bernards, A. *et al.* GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* **14**, 377–385 (2004).
171. Bernards, A. & Settleman, J. GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* **23**, 143–149 (2005).
172. Arafeh, R. *et al.* Recurrent inactivating RASA2 mutations in melanoma. *Nat. Genet.* **47**, 1408–1410 (2015).
173. McLaughlin, S. K. *et al.* The RasGAP gene, RASAL2, is a tumor and metastasis suppressor. *Cancer Cell* **24**, 365–78 (2013).
174. Feng, M. *et al.* RASAL2 activates RAC1 to promote triple-negative breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 5291–5304 (2014).
175. Ohta, M. *et al.* Decreased Expression of the RAS-GTPase Activating Protein RASAL1 Is Associated With Colorectal Tumor Progression. *Gastroenterology* **136**, 206–216 (2009).
176. Olsen, S. N. *et al.* Loss of RasGAP Tumor Suppressors Underlie the Aggressive Nature of Luminal B Breast Cancers. *Cancer Discov.* (2016).
177. Maertens, O. & Cichowski, K. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Adv. Biol. Regul.* **55**, 1–14 (2014).
178. Liu, Y. *et al.* Downregulation of Ras GTPase-activating protein 1 is associated with poor survival of breast invasive ductal carcinoma patients. *Oncology reports* (2014). doi:10.3892/or.2014.3604
179. Johannsdottir, H. K. *et al.* Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors. *Int. J. Cancer* **119**, 1052–1060 (2006).
180. Adelaide, J. *et al.* Integrated Profiling of Basal and Luminal Breast Cancers. *Cancer Res.* **67**, 11565–11575 (2007).
181. Hu, X. *et al.* Genetic Alterations and Oncogenic Pathways Associated with Breast Cancer Subtypes. *Mol. Cancer Res.* **7**, 511–522 (2009).
182. Cichowski, K. *et al.* Mouse Models of Tumor Development in Neurofibromatosis Type 1. *Science (80-. ).* **286**, (1999).
183. Vogel, K. S. *et al.* Mouse Tumor Model for Neurofibromatosis Type 1. *Science (80-. ).* **286**, (1999).
184. Zhu, Y. *et al.* Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell* **8**, 119–30 (2005).
185. Courtois-Cox, S. *et al.* A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459–72 (2006).
186. Keng, V. W. *et al.* PTEN and NF1 Inactivation in Schwann Cells Produces a Severe Phenotype in the Peripheral Nervous System That Promotes the Development and Malignant Progression of Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Cancer Res.* **72**, 3405–3413 (2012).
187. Mendes-Pereira, A. M. *et al.* Genome-wide functional screen identifies a compendium

- of genes affecting sensitivity to tamoxifen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2730–5 (2012).
188. Roof, R. W. *et al.* Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7052–63 (1998).
  189. Fincham, V. J., Chudleigh, A. & Frame, M. C. Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J. Cell Sci.* 947–56 (1999). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036244>>
  190. Kulkarni, S. V., Gish, G., Van Der Geer, P., Henkemeyer, M. & Pawson, T. Role of p120 Ras-GAP in directed cell movement. *J. Cell Biol.* **149**, 457–470 (2000).
  191. Arthur, W. T. & Burridge, K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2711–20 (2001).
  192. Takaishi, K. *et al.* Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* **9**, 273–9 (1994).
  193. Nobes, C. D. & Hall, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* **144**, 1235–44 (1999).
  194. Zhao, Z.-A. *et al.* The roles of ERAS during cell lineage specification of mouse early embryonic development. *Open Biol.* **5**, 150092 (2015).
  195. Bhattacharya, B. *et al.* Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood* **103**, 2956–64 (2004).
  196. Kameda, T. & Thomson, J. A. Human *ERas* Gene Has an Upstream Premature Polyadenylation Signal That Results in a Truncated, Noncoding Transcript. *Stem Cells* **23**, 1535–1540 (2005).
  197. Cheng, A. M. *et al.* Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* **95**, 793–803 (1998).
  198. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J. & Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Dev. Biol.* **210**, 30–43 (1999).
  199. Yasuda, K., Yashiro, M., Sawada, T., Ohira, M. & Hirakawa, K. ERas oncogene expression and epigenetic regulation by histone acetylation in human cancer cells. *Anticancer Res.* **27**, 4071–5 (2007).
  200. Chaligné, R. & Heard, E. X-chromosome inactivation in development and cancer. *FEBS Lett.* **588**, 2514–2522 (2014).
  201. Chaligné, R. *et al.* The inactive X chromosome is epigenetically unstable and transcriptionally labile in breast cancer. *Genome Res.* **25**, 488–503 (2015).
  202. Richardson, A. L. *et al.* X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* **9**, 121–132 (2006).
  203. Morel, A.-P. *et al.* Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS One* **3**, e2888 (2008).

204. Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1938–1948 (2010).
205. Costa, P. M. & Pedroso de Lima, M. C. MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression. *Pharmaceuticals (Basel)*. **6**, 1195–220 (2013).
206. Wu, S. Y., Lopez-Berestein, G., Calin, G. A. & Sood, A. K. RNAi therapies: drugging the undruggable. *Sci. Transl. Med.* **6**, 240ps7 (2014).
207. Damiano, V. *et al.* Epigenetic silencing of miR-200c in breast cancer is associated with aggressiveness and is modulated by ZEB1. *Genes, Chromosom. Cancer* **56**, 147–158 (2017).
208. Manavalan, T. T. *et al.* Reduced expression of miR-200 family members contributes to antiestrogen resistance in LY2 human breast cancer cells. *PLoS One* **8**, e62334 (2013).
209. Neves, R. *et al.* Role of DNA methylation in miR-200c/141 cluster silencing in invasive breast cancer cells. *BMC Res. Notes* **3**, 219 (2010).
210. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
211. Nahta, R. Pharmacological strategies to overcome HER2 cross-talk and Trastuzumab resistance. *Curr. Med. Chem.* **19**, 1065–75 (2012).
212. Paplomata, E., Zelnak, A. & O'Regan, R. Everolimus: side effect profile and management of toxicities in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **140**, 453–462 (2013).
213. Kubota, E. *et al.* ERas enhances resistance to CPT-11 in gastric cancer. *Anticancer Res.* **31**, 3353–60 (2011).
214. Borcherdig, N., Kusner, D., Liu, G.-H. & Zhang, W. ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology. *Protein Cell* **5**, 496–502 (2014).
215. Chien, H.-P. *et al.* Expression of ROR1 has prognostic significance in triple negative breast cancer. *Virchows Arch.* **468**, 589–95 (2016).
216. DeYoung, M. P. & Ellisen, L. W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* **26**, 5169–5183 (2007).
217. Inoue, K. & Fry, E. A. in *Sub-cellular biochemistry* **85**, 17–40 (2014).
218. Yoh, K. E. *et al.* Repression of p63 and induction of EMT by mutant Ras in mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6107–E6116 (2016).
219. Castellano, E. & Santos, E. Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different. *Genes Cancer* **2**, 216–31 (2011).
220. Brown, K., Strathdee, D., Bryson, S., Lambie, W. & Balmain, A. The malignant capacity of skin tumours induced by expression of a mutant H-ras transgene depends on the cell type targeted. *Curr. Biol.* **8**, 516–24 (1998).
221. Yanagawa, T. *et al.* Nrf2 deficiency causes tooth decolourization due to iron transport disorder in enamel organ. *Genes to Cells* **9**, 641–651 (2004).

222. Segrelles, C. *et al.* Deregulated Activity of Akt in Epithelial Basal Cells Induces Spontaneous Tumors and Heightened Sensitivity to Skin Carcinogenesis. *Cancer Res.* **67**, 10879–10888 (2007).
223. Bol, D. K., Kiguchi, K., Gimenez-Conti, I., Rupp, T. & DiGiovanni, J. Overexpression of insulin-like growth factor-1 induces hyperplasia, dermal abnormalities, and spontaneous tumor formation in transgenic mice. *Oncogene* **14**, 1725–1734 (1997).
224. Drosten, M., Lechuga, C. G. & Barbacid, M. Ras signaling is essential for skin development. *Oncogene* **33**, 2857–2865 (2014).
225. Oki-Idouchi, C. E. & Lorenzo, P. S. Transgenic Overexpression of RasGRP1 in Mouse Epidermis Results in Spontaneous Tumors of the Skin. *Cancer Res.* **67**, 276–280 (2007).
226. Moumen, M. *et al.* The Proto-Oncogene Myc Is Essential for Mammary Stem Cell Function. *Stem Cells* **30**, 1246–1254 (2012).
227. Wang, D. *et al.* Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression. *Nature* **517**, 81–84 (2014).
228. Hungermann, D., Buerger, H., Oehlschlegel, C., Herbst, H. & Boecker, W. Adenomyoepithelial tumours and myoepithelial carcinomas of the breast – a spectrum of monophasic and biphasic tumours dominated by immature myoepithelial cells. *BMC Cancer* **5**, 92 (2005).
229. Rehm, S. Chemically induced mammary gland adenomyoepitheliomas and myoepithelial carcinomas of mice. Immunohistochemical and ultrastructural features. *Am. J. Pathol.* **136**, 575–84 (1990).

# A Transposon-based Analysis Reveals RASA1 Is Involved in Triple-Negative Breast Cancer

Cristian Suarez-Cabrera<sup>1,2</sup>, Rita M. Quintana<sup>1</sup>, Ana Bravo<sup>3</sup>, M. Llanos Casanova<sup>1,2</sup>, Angustias Page<sup>1,2</sup>, Josefa P. Alameda<sup>1,2</sup>, Jesus M. Paramio<sup>1,2</sup>, Alicia Maroto<sup>4</sup>, Javier Salamanca<sup>4</sup>, Adam J. Dupuy<sup>5</sup>, Angel Ramírez<sup>1,2</sup>, and Manuel Navarro<sup>1,2</sup>

## Abstract

RAS genes are mutated in 20% of human tumors, but these mutations are very rare in breast cancer. Here, we used a mouse model to generate tumors upon activation of a mutagenic T2Onc2 transposon via expression of a transposase driven by the keratin K5 promoter in a p53<sup>+/-</sup> background. These animals mainly developed mammary tumors, most of which had transposon insertions in one of two RASGAP genes, neurofibromin1 (*NF1*) and RAS p21 protein activator (*Rasa1*). Immunohistochemical analysis of a collection of human breast tumors confirmed that low expression of RASA1 is frequent in basal (triple-negative) and

estrogen receptor (ER)-negative tumors. Bioinformatic analysis of human breast tumors in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database showed that although *RASA1* mutations are rare, allelic loss is frequent, particularly in basal tumors (80%) and in association with TP53 mutation. Inactivation of *RASA1* in MCF10A cells resulted in the appearance of a malignant phenotype in the context of mutated p53. Our results suggest that alterations in the Ras pathway due to the loss of negative regulators of RAS may be a common event in basal breast cancer. *Cancer Res*; 1–14. 2017 AACR.

## Introduction

Ras genes are some of the most frequently mutated in human cancer. According to the catalog of somatic mutations in cancer (COSMIC v77; ref. 1), which represents the most comprehensive database on human cancer mutations currently available, around 20% of the analyzed tumors have activating mutations in any of the 3 Ras genes, with a maximum of 57% incidence for *KRAS* in pancreatic tumors. Ras signaling may also be activated by other means, notably by inactivation of molecules that limit Ras activity, such as Ras GTPase-activating proteins (RasGAP). Ras proteins are molecular switches that

cycle between an inactive GDP-bound form and an active GTP-bound form. They signal through several effector pathways, and RasGAPs stimulate the weak intrinsic GTPase activity of normal (but not mutant) Ras proteins, effectively acting as suppressors of Ras function. Interestingly, less than 1% of the near 10,000 breast cancer samples sequenced in COSMIC have mutations in Ras genes; however, the Ras pathway is significantly activated in a number of breast tumors, in particular of the triple-negative type (2).

Breast cancer is by far the most frequent tumor type in the female population worldwide (25% of all new cases in 2012), and although its mortality rate is not the highest, it is the most frequent cause of cancer death in women (14.7% of all deaths in 2012; ref. 3). Triple-negative breast cancers [TNBC; which are negative for HER2, estrogen receptor (ER) $\alpha$ , and the progesterone receptor] constitute a heterogeneous group of tumors which very often exhibit a basal-like signature (4). Although they represent approximately 15% of all breast cancers, they account for a much higher mortality: they are tumors with a poor prognostic, mainly due to the lack of specific targets for treatment. These triple-negative tumors are enriched for mutations in *TP53*. Indeed, *TP53* is mutated in 36% of all breast cancers, but this proportion increases to 86% in PAM50 basal-like tumors (5). TNBC tumors also bear a highly variable number of genomic alterations, including the presence of a large number of somatic mutations and copy number aberrations (CNA; ref. 6), suggesting that (i) combinations of mutations interact to drive tumor formation and (ii) most of the mutations found are "passengers," not related to development of the tumor.

Transposon-induced mutagenesis is an excellent method to identify cancer driver genes. For example, when mobilized by Sleeping Beauty (SB) transposase, the mutagenic T2Onc2 transposon integrates throughout the genome, and cells with

<sup>1</sup>Molecular Oncology Unit, Centro de Investigaciones Energeticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)/CIBERONC, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Biomedical Research Institute I+12, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Department of Veterinary Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain. <sup>4</sup>Department of Pathology, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain. <sup>5</sup>Department of Anatomy and Cell Biology, Roy J. & Lucille A. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, Iowa.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

C. Suarez-Cabrera and R.M. Quintana contributed equally to this study.

Current address for R.M. Quintana: Invitae Corporation, San Francisco, California.

**Corresponding Authors:** Manuel Navarro, Molecular Oncology Unit, Centro de Investigaciones Energeticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Av. Complutense 40, Madrid 28040, Spain. Phone: 34-914962528; Fax: 34-913466484; E-mail: [manuel.navarro@ciemat.es](mailto:manuel.navarro@ciemat.es); and Angel Ramírez, Molecular Oncology Unit, Centro de Investigaciones Energeticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Av. Complutense 40, Madrid 28040, Spain. Phone: 34-913460882; E-mail: [a.ramirez@ciemat.es](mailto:a.ramirez@ciemat.es)

**doi:** 10.1158/0008-5472.CAN-16-1586

2017 American Association for Cancer Research.